

Einsatzmöglichkeiten der Mizellaren Elektrokinetischen Chromatographie

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Alexander Dworschak

aus Marburg

Marburg/Lahn 2000

Inhaltsverzeichnis

	Inhaltsverzeichnis	I
	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Symbole	IV
1	Einleitung und Aufgabenstellung	1
2	Grundlagen der Mizellaren Elektrokinetischen Chromatographie (MEKC)	4
2.1	Elektrophoretische Mobilität	4
2.2	Elektroosmotischer Fluß (EOF)	5
2.3	Trennprinzip der Mizellaren Elektrokinetischen Chromatographie	9
2.4	Chromatographische Kennzahlen	11
2.5	Das verwendete Kapillarelektrophorese Gerät	14
3	Einsatz kationischer Tenside	17
3.1	Einleitung	17
3.2	Umkehr des elektroosmotischen Flusses (EOF) durch kationische Tenside	18
3.3	Auswahlkriterien für den Einsatz von Tensiden in der MEKC	19
3.3.1	Kritische mizellare Konzentration (CMC)	20
3.3.2	Löslichkeit	23
3.3.3	KRAFFT-Punkt	24
3.4	Wirkende Trennmechanismen in der MEKC	24
3.5	Anwendung von kationischen Tensiden zur Trennung von Vanille-Bestandteilen	26
4	Variation der Zusammensetzung des Trennelektrolyten	28
4.1	Spülprozedur	28
4.2	Bestimmung charakteristischer Größen	29
4.3	Variation des pH-Werts	30
4.4	Variation der Tensidkonzentration	35
4.5	Variation der Alkylkettenlänge	38

4.6	Wechselwirkung kationischer Tenside mit den Analyten	43
4.6.1	Messungen mit kationischen Tensiden unterhalb der CMC	43
4.6.2	Messungen oberhalb der CMC	45
5	Analyse von Vanille-Zubereitungen	48
5.1	Zusammensetzung handelsüblicher Vanille-Präparate	48
5.2	Analyse eines käuflichen Vanille-Extrakts	51
5.3	Weitere analysierte Realproben	54
6	Wiederholpräzision	58
7	Einsatz von Modifiern bei Verwendung kationischer Tenside	65
7.1	Einführung	65
7.2	Einsatz organischer Modifier	66
7.3	Einsatz quartärer Ammoniumverbindungen	69
7.3.1	Zugabe von OTAB und TBAB	71
7.3.2	Zugabe von HMB	78
7.4	Einsatz von Metallsalzen	82
7.5	Einsatz von Hydroxypropylmethylcellulose	90
7.6	Übersicht über die eingesetzten Modifier	93
8	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie	94
8.1	Kenngößen der Chromatographie	95
8.2	Die verwendete HPLC-Apparatur	95
9	Polare Aminoaromaten	98
9.1	Vorarbeiten	98
9.2	Derivatisierung aromatischer Amine	103
9.3	Entwicklung eines Derivatisierungsverfahrens	104
10	Optimierung der Derivatisierungs-Bedingungen	107
10.1	pH-Abhängigkeit der Derivatisierungsausbeute	107
10.2	Zeit-Abhängigkeit der Derivatisierungsausbeute	110
10.3	Temperatur-Abhängigkeit der Derivatisierungsausbeute	112

11	Arbeiten unter optimalen Derivatisierungsbedingungen	113
11.1	Ermittlung der Derivatisierungsausbeute	113
11.2	Flüssig-flüssig Extraktion der Derivatlösungen	116
11.3	Stabilität der erhaltenen Derivate	118
12	Trennung nach Derivatisierung	119
13	Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze	122
14	Trennung der derivatisierten Analyte mit der MEKC	126
14.1	Einführung	126
14.2	Trennung mit anionischem Tensid	128
14.3	Vergleich des MEKC-Verfahrens mit dem HPLC-Verfahren	131
15	Zusammenfassung	135
16	Literatur	138
17	Anhang	146
17.1	Verwendete Referenzsubstanzen	146
17.2	Verwendete Chemikalien	148
17.3	Verwendete Geräte und Software	150
17.3.1	MEKC-System	150
17.3.2	HPLC-System	150

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Symbole

A	Peakfläche
A ⁻	deprotonierte Form acider Analyten
AZ	Aggregationszahl
BG	Bestimmungsgrenze
CE	Kapillar-Elektrophorese
CMC	kritische mizellare Konzentration
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CZE	Kapillar-Zonen-Elektrophorese
DA	Derivatisierungsausbeute
DoTAB	Dodecyltrimethylammoniumbromid
E	Extinktion
EOF	elektroosmotischer Fluß
F	elektrische Feldstärke
FKW	Fluorkohlenwasserstoff
Fmoc-Cl	9-Fluorenylmethylchloroformiat
G	Leitwert
GC	Gaschromatographie
H	Peakhöhe
HA	protonierte Form acider Analyten
HMB	Hexamethoniumbromid
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose
I.D.	Innendurchmesser
k	Retentionsfaktoren
k [*]	Pseudo-Retentionsfaktoren
K _a	Dissoziationskonstante
K _{IP}	Ionenpaar-Bildungskonstante
K _{mw,HA} ; K _{mw,A}	Verteilungskonstante zwischen Mizelle und Analytspezies
L _{eff}	Kapillarlänge bis Detektor
L _{ges}	Gesamte Kapillarlänge
MEKC	Mizellare Elektrokinetische Chromatographie

MS	Massenspektrometrie
N	Trennstufenzahl
NG	Nachweisgrenze
OTAB	Octyltrimethylammoniumbromid
PK	Peakkapazität
R	Auflösung
RP	Umkehrphase
RSD	Relative Standardabweichung
RT	Raumtemperatur (21-23° C)
SDS	Natriumdodecylsulfat
t_0	Durchflußzeit
t_{MC}	Retentionszeit der Mizellen
t_r	Retentionszeit der Analyte
TBAB	Tetrabutylammoniumbromid
TTAB	Tetradecyltrimethylammoniumbromid
U	Trennspannung
v	Wanderungsgeschwindigkeit
WW	Wechselwirkungen
α	Selektivitätsfaktor
β	Massenkonzentration
ε	elektrische Durchlässigkeit ($\varepsilon = 4 \pi \varepsilon_0 \varepsilon_r$)
ε_0	elektrische Feldkonstante
ε_r	Dielektrizitätskonstante
φ	Volumenanteil
κ	Spezifische Leitfähigkeit
λ	Wellenlänge
μ_{eo}	elektroosmotische Mobilität
μ_{ep}	effektive elektrophoretischen Mobilität der Ionen
μ_{MC}	elektrophoretische Mobilität der Mizellen
ζ	elektrokinetisches Potential (Zeta-Potential)

1 Einleitung und Aufgabenstellung

Die bekanntesten kapillarelektroseperativen Methoden sind die Kapillar-Zonenelektrophorese (CE oder CZE), die Kapillar-Elektrochromatographie (CEC) und die Mizellare Elektrokinetische Chromatographie (MEKC). Während die CZE nur zur Trennung geladener Analyte eingesetzt werden kann, gelingt es mit der MEKC, durch Verteilung zwischen einer wäßrigen und einer mizellaren Hilfsphase auch ungeladene Analyte aufzutrennen [1-3]. Die MEKC kann als Spezialfall der CE aufgefaßt werden. Die MEKC hat sich hinsichtlich der erzielbaren chromatographischen Effizienz der üblicherweise eingesetzten Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) in vielen Routineanwendungen als überlegen erwiesen. Interessant ist insbesondere die Möglichkeit, durch Variation der Zusammensetzung des Trennelektrolyten die Selektivität des Trennsystems über einen weiten Bereich zu variieren.

In der MEKC wird zur Erzeugung der pseudostationären mizellaren Phase dem Trennelektrolyten üblicherweise das anionische Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS) zugesetzt. Frühere Arbeiten haben jedoch gezeigt, daß auch kationische Tenside erfolgreich in der MEKC eingesetzt werden können [4,5]. Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Einsatzmöglichkeiten kationischer Tenside aufzuzeigen. Mögliche kationische Tenside sind die homologen Alkyltrimethylammoniumbromide Dodecyltrimethylammoniumbromid (DoTAB), Tetradecyltrimethylammoniumbromid (TTAB) und Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB).

Die physikochemischen Daten, Löslichkeit und kritische mizellare Konzentration (CMC), dieser Tenside sollen ermittelt werden. Diese Daten und die erzielten Trennungen von Inhaltsstoffen der Vanille können als Beurteilungskriterien für die Einsatzmöglichkeiten der kationischen Tenside in der MEKC herangezogen werden.

Bei den Trennungen sollen die Größen

- Tensidkonzentration,
- pH-Wert und
- Alkylkettenlänge (kationisches Tensid) variiert werden.

Anhand der Trennungen soll auch geklärt werden, welche Wechselwirkungen (WW) zwischen den kationischen Tensid-Monomeren und den Analyten bzw. zwischen den gebildeten Mizellen und den Analyten, besonders den negativ geladenen dissoziierten, vorherrschend sind.

Ein entscheidender Parameter der Verfahrensvalidierung ist die Wiederholpräzision. Die Eignung kationischer Tenside als Mizellenbildner in der MEKC zur Analyse von Realproben soll am Beispiel kommerzieller Vanilleextrakte durch Ermittlung der Wiederholpräzision für die Retentionszeiten, sowie für die Peakflächen und -höhen überprüft werden. Zur Beurteilung der erhaltenen Daten sollen diese mit Ergebnissen, die mit SDS als Mizellenbildner erreicht werden, verglichen werden.

Aus früheren Arbeiten in der MEKC ist das im Vergleich zu Arbeiten mit SDS als Mizellenbildner relativ schmale Retentionsfenster bei Verwendung von kationischen Tensiden bekannt. Die Suche nach geeigneten Modifier zur Aufweitung des Retentionsfensters stellt einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit dar.

Während die HPLC eine Methode ist, die in zahlreichen Routineverfahren eingesetzt wird, ist die MEKC als potentiell leistungsfähigere Methode aufzufassen. Die MEKC weist gegenüber der HPLC einen deutlich geringeren Verbrauch an mobiler Phase, geringere erforderliche Probenvolumina, kürzere Analysenzeiten und vor allem eine bessere unter Routinebedingungen erreichbare Trennleistung auf (Trennstufenzahlen $N > 200.000$ gegenüber $N < 50.000$ bei der HPLC unter isokratischen Bedingungen). Die Routinetauglichkeit der MEKC ist jedoch noch nicht hinreichend durch Experimente mit Realproben bewiesen.

Am Beispiel der umweltrelevanten amphoteren aromatischen Amine (Amino[nitro]benzoesäuren, Amino[methyl, nitro]benzolsulfonsäuren und Amino[methyl, nitro]phenole) soll exemplarisch die Leistungsfähigkeit der MEKC demonstriert werden.

Erforderlich ist hierzu die Erarbeitung einer Vorschrift zur Derivatisierung der amphoteren Aminoaromaten. Angestrebt wird die Derivatisierung mit 9-Fluorenylmethylchloroformiat (FMOC-Cl), um stabile, relativ unpolare und empfindlich detektierbare Derivate der aromatischen Amine zu erhalten. Die Derivatisierung soll hinsichtlich der Parameter

- Derivatisierungszeit,
- pH-Wert und
- Temperatur optimiert werden.

Nachteilig beim Einsatz der MEKC als Trennmethode ist, daß aufgrund des geringen Detektionsvolumens und des kleinen aufgegebenen Probenvolumens die mit dieser Methode erhaltenen Nachweis- (NG) und Bestimmungsgrenzen (BG) in der Regel deutlich höher als in der HPLC sind. Zur Beschreibung der Leistungsfähigkeit der MEKC sollen daher für ein ausgearbeitetes Verfahren unter Verwendung der MEKC die Größen

- Linearität der Kalibrierfunktion,
- Dauer eines chromatographischen Laufs sowie
- Nachweis- und Bestimmungsgrenze

ermittelt und mit den Leistungsdaten eines alternativen HPLC-Verfahrens verglichen werden.

2 Grundlagen der Mizellaren Elektrokinetischen Chromatographie (MEKC)

2.1 Elektrophoretische Mobilität

In einem elektrischen Feld bewegen sich geladene Teilchen in einem reibendem Medium mit einer konstanten Geschwindigkeit (Elektrophorese). Betrag und Richtung der Geschwindigkeit der geladenen Teilchen sind von der Ladung und der Größe der Teilchen abhängig.

Geladene Teilchen unterliegen im elektrischen Feld einer Beschleunigungskraft, der eine Reibungskraft, angenähert beschrieben durch das STOKESche Gesetz, entgegen gerichtet ist. Durch Gleichsetzen dieser Kräfte wird Gl.1 erhalten. Im Gleichgewicht ist die vektorielle Summe dieser Kräfte Null und für jedes Ion resultiert eine stoffspezifische konstante Wanderungsgeschwindigkeit v .

$$z \cdot e \cdot F = -6\pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad (1)$$

z = Ionenladung

e = Elementarladung des Elektron ($e = 1,602 \cdot 10^{-19} \text{ C}$)

F = elektrische Feldstärke

η = Viskosität der Lösung

r = hydrodynamischer Ionenradius

Erhöhung der zur Erzeugung des elektrischen Feldes zwischen zwei Elektroden anliegenden Spannung und damit wachsende Feldstärke F des elektrischen Feldes zwischen den Elektroden führen stets zu einer Erhöhung der Wanderungsgeschwindigkeit v der Teilchen. Durch Auflösen von Gl.1 nach v und Normierung auf die Feldstärke F wird als stoffspezifische Größe die elektrophoretische Mobilität μ erhalten (Gl.2).

$$|\mu| = \frac{v}{F} = \frac{z \cdot e}{6\pi \cdot \eta \cdot r} \quad (2)$$

2.2 Elektroosmotischer Fluß (EOF)

Während die Elektrophorese die Trennung von geladenen Teilchen unterschiedlicher Mobilität ermöglicht, erzeugt die Elektroosmose einen Fluß der Pufferlösung im elektrischen Feld. Im Falle üblicher experimenteller Anordnungen für die CZE und die MEKC (s. Abb.5) entsteht der elektroosmotische Fluß (EOF) durch Ladungsverteilung in der Lösung in der Nähe der Kapillaroberfläche. Die Oberfläche der in der Kapillarelektrophorese (CE) verwendeten Quarzkapillare ist reich an Silanol (-Si-OH)-Gruppen, welche mit einem pK_S -Wert um 2 sehr acide sind. Bei den in den CE-Trenntechniken verwendeten Trennelektrolyten liegt der pH-Wert in der Regel oberhalb von 2, und an der Oberfläche entsteht durch die Deprotonierung der Silanolgruppen (-Si-O⁻) eine negative Überschußladung. Dieser negativen Ladung stehen positiv geladene Ionen der Pufferlösung gegenüber, wodurch sich ein elektrisches Potential ausbildet.

Nach der Theorie von STERN, bildet sich eine Doppelschicht aus, bei der eine starre und eine diffuse Grenzschicht unterschieden wird (Abb.1). Die starre Grenzschicht (STERN- oder HELMHOLTZ-Schicht) besteht aus direkt an der Oberfläche adsorbierten Ionen und die diffuse Schicht (GOUY-CHAPMAN-Schicht) aus locker gebundenen Ionen. Die Abnahme des elektrischen Potentials erfolgt in der starren Schicht linear und in der diffusen exponentiell. Das Potential an der Grenzschicht zwischen starrer und diffuser Schicht ist für die Elektroosmose verantwortlich und wird als elektrokinetisches ζ -Potential bezeichnet.

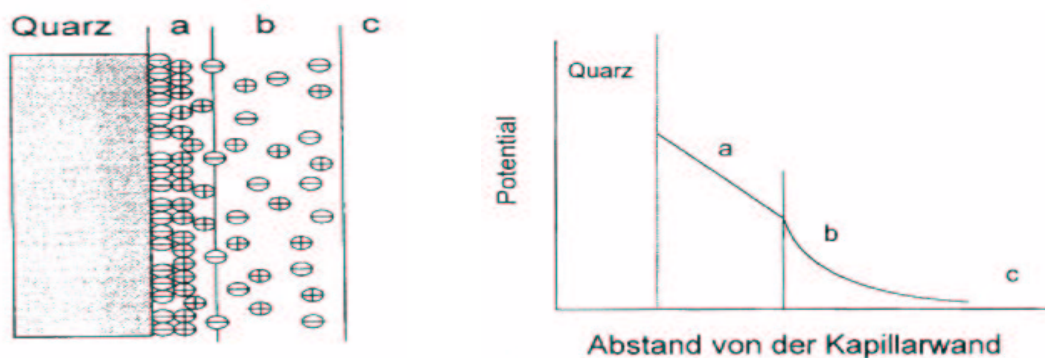


Abb.1: Ausbildung des ζ -Potentials und die Abnahme des elektrischen Potentials an der Grenzfläche Puffer/Quarz

a: starre Grenzschicht mit adsorbierten Ionen b: diffuse Grenzschicht c: Trennelektrolyt

2 Grundlagen der Mizellaren Elektrokinetischen Chromatographie

Wird in der Kapillare ein elektrisches Feld erzeugt, bewegen sich die Kationen aus der diffusen Schicht in Richtung Kathode. Aufgrund von Reibungskräften wird die gesamte Lösung im Inneren der Kapillare in Richtung Kathode mitbewegt, wobei sich ein der angelegten Feldstärke proportionaler elektroosmotischer Fluß (EOF) ausbildet. Die Geschwindigkeit des so erzeugten elektroosmotischen Flusses ergibt sich aus der Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung (Gl.3).

$$v_{eo} = \frac{\varepsilon \cdot F \cdot \zeta}{4\pi \cdot \eta} = \frac{\varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r \cdot F \cdot \zeta}{\eta} \quad (3)$$

v_{eo} = elektroosmotische Strömungsgeschwindigkeit

ε = elektrische Durchlässigkeit ($\varepsilon = 4 \pi \varepsilon_0 \varepsilon_r$)

ε_0 = elektrische Feldkonstante

ε_r = Dielektrizitätskonstante

ζ = elektrokinetisches Potential

In der Praxis wird überwiegend der Begriff elektroosmotische Mobilität μ_{eo} , der definiert ist als die Geschwindigkeit des elektroosmotischen Flusses v_{eo} normiert auf die wirkende Feldstärke F (Gl.4), verwendet.

$$\mu_{eo} = \frac{v_{eo}}{F} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{4\pi \cdot \eta} = \frac{\varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r \cdot \zeta}{\eta} \quad (4)$$

μ_{eo} = elektroosmotische Mobilität

Ein Vorteil des elektroosmotischen Flusses (EOF) ist das sich ausbildende flache stempelförmige Strömungsprofil. Dieses Profil ist einer der Hauptgründe für die hohe Trennleistung in CE-Trennungen. Bei einem druckgetriebenen Fluß bildet sich hingegen ein parabolisches HAGEN-POISSEUILLESches Strömungsprofil aus, welches zu einer deutlichen Bandenverbreiterung durch eine Verteilung der Strömungsgeschwindigkeiten der Flüssigkeitspakete führt (Abb.2). Dieser Mechanismus der Bandenverbreiterung ist in der CE nahezu unterdrückt.



Abb.2: Vergleichende Abbildung eines durch Druckdifferenz verursachten Flußprofils (A) und eines elektrokinetisch erzeugten Flußprofils (B)

Eine in die Kapillare eingebrachte Probe, bestehend aus unterschiedlichen Ionen, wird entsprechend der elektrophoretischen Mobilität der Ionen μ_{ep} aufgetrennt. Die elektroosmotische Mobilität addiert sich vektoriell zur elektrophoretischen Mobilität der Ionen, so daß mit einer Probenaufgabe auf anionischer Seite, so lange $|\mu_{ep}| < |\mu_{eo}|$ ist, auch Anionen auf der Kathodenseite detektiert werden können. Der EOF ermöglicht somit die Trennung und Detektion von kationischen und anionischen Probenbestandteilen innerhalb einer Analyse.

Durch Modifikationen kann der EOF kontrolliert, ausgeschaltet oder umgekehrt werden. Einflußgrößen zur Steuerung des EOF sind die Ladung an der Kapillarinnenwand, die Dicke der sich ausbildenden Doppelschicht und die Viskosität des Trennelektrolyten. Der EOF nimmt mit der Zahl dissoziierter Silanolgruppen pro Flächeneinheit der Kapillarinnenwand, d.h. mit steigendem pH-Wert (Abb.3), zu. Mit Zusätzen, die an den dissoziierten negativen Silanolgruppen adsorbieren, ist es möglich, den EOF zu verlangsamen oder umzukehren. (Zur Umkehr des EOF unter Einsatz kationischer Tenside siehe Kap.3.2). Durch chemische Umsetzung der Silanolgruppen der Kapillarwandung mit z.B. Trimethylchlorsilan kann der EOF nahezu vollständig unterdrückt werden. Eine Abnahme des EOF mit zunehmender Ionenstärke des Trennelektrolyten ist in der damit einhergehenden Verringerung des elektrokinetischen Potentials begründet. Die verschiedenen Modifikationen, die den elektroosmotischen Fluß beeinflussen, sind in Tab.1 noch einmal zusammengefaßt aufgelistet.

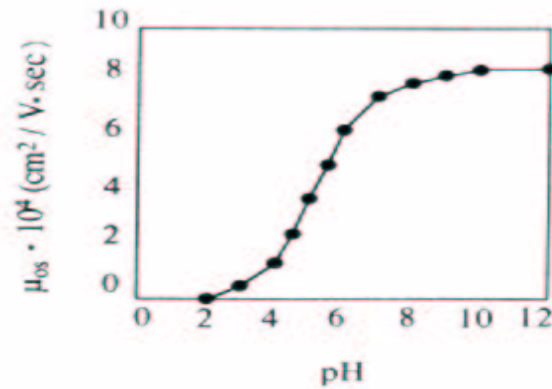


Abb.3: Abhängigkeit der elektroosmotischen Mobilität vom pH-Wert des Trennelektrolyten [6]

Tab.1: Mögliche Modifikationen zur Beeinflussung des EOF in Quarzglaskapillaren

Modifikation	Auswirkung auf den EOF
pH-Wert des Puffers	v nimmt mit dem pH-Wert zu (Abb.3)
Pufferkonzentrationen	v nimmt mit abnehmender Ionenstärke zu
Zugabe von Kationen	Verringerung der Geschwindigkeit
Zugabe von kationischen Tensiden	Verringerung der Geschwindigkeit und Möglichkeit der Umkehr des EOF
chemische Modifikation	Ausschalten des EOF
Temperatur	verändert die Viskosität und damit v
Organische Lösungsmittel	verändern die Viskosität und die Dielektrizitätskonstante und damit v

2.3 Trennprinzip der Mizellaren Elektrokinetischen Chromatographie

In der Kapillar-Zonenelektrophorese (CZE) können nur geladene Analyte aufgetrennt werden. Ungeladene Analyte erreichen, aufgrund fehlender Eigenmobilität im elektrischen Feld, unaufgetrennt mit der Geschwindigkeit des EOF den Detektorraum. Mit der 1984 von TERABE et al. [7,8] beschriebenen Mizellaren Elektrokinetischen Chromatographie (MEKC) können zusätzlich ungeladenen Analyte voneinander getrennt werden.

Zum Trennelektrolyten werden bei der MEKC oberhalb einer bestimmten Konzentration, der sogenannten kritischen mizellaren Konzentration (CMC), Tenside zugesetzt. In einer Konzentration oberhalb der CMC bilden diese Tenside aufgrund ihres hydrophoben Restes Mizellen (Abb.4) aus. Diese Aggregate haben im Inneren hydrophoben Charakter und sind im Falle anionischer und kationischer Tenside nach außen geladen. Die Anzahl an Tensidmonomeren, aus denen eine Mizelle aufgebaut ist, wird Aggregationszahl (AZ) genannt. In Lösung sind Mizellen ein dynamisches Gebilde, das im Gleichgewicht mit seinen Monomeren steht. Durch den Austausch von Monomeren werden ständig neue Mizellen erzeugt und die AZ stellt somit nur einen Mittelwert dar.

Für die mizellare Phase wurde von TERABE et al. [7] der Begriff pseudostationäre Phase geprägt. In der MEKC wird ausgenutzt, daß die mizellare Phase eine elektrophoretische Mobilität aufweist. Sie hat somit im elektrischen Feld eine Geschwindigkeit, die von der des umgebenden wäßrigen Mediums verschieden ist.

Die Trennung ungeladener Analyte beruht auf einer unterschiedlichen Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Analyte in der pseudostationären mizellaren Phase und der mobilen wäßrigen Phase. Die beobachtete Mobilität ungeladener Analyte ist damit abhängig von der Verteilungskonstanten K zwischen den beiden Phasen. Das in der MEKC wirkende Trennprinzip für ungeladene Analyte ist daher vergleichbar mit dem der Verteilungschromatographie.

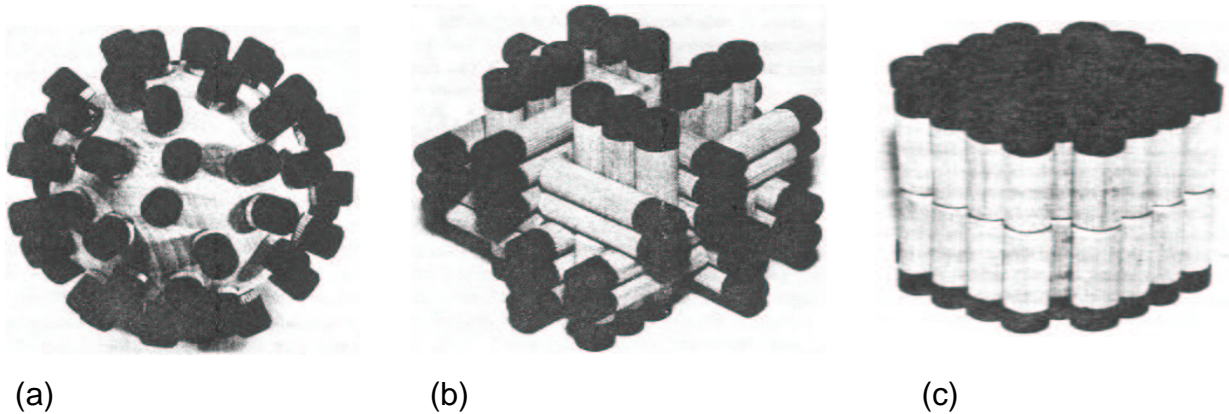


Abb.4: Unterschiedliche Modellannahmen zur Mizellen-Struktur [9]

- (a) Tröpfchen-Struktur
- (b) Tensidblock-Struktur
- (c) Bilayerfragment-Struktur

Die resultierende Elutionsreihenfolge ergibt sich bei nicht vorhandener elektrophoretischer Mobilität der Analyte ausschließlich durch die unterschiedlichen Verteilungskonstanten. Besitzen die zu trennenden Analyte eine elektrophoretische Mobilität μ_{ep} wird die Elutionsreihenfolge nicht nur durch Unterschiede in den Verteilungskonstanten, sondern ebenfalls durch Unterschiede in μ_{ep} bestimmt. Neben der Verteilung ist dann auch die Elektrophorese als Trennprinzip wirksam.

Das in der MEKC am häufigsten eingesetzte Tensid ist Natriumdodecylsulfat (SDS). Bei Verwendung dieses Tensids tragen die entstehenden Mizellen eine negative Ladung. Bei einer Probenaufgabe auf anionischer Seite und Detektion auf der kationischen verteilen sich die Analyte zwischen dem wäßrigen Trennelektrolyten (Transport mit dem EOF zur Kathode) und dem Inneren der Mizellen (Wanderung in Gegenrichtung). So lange der Betrag der elektrophoretischen Mobilität der Mizellen μ_{MC} kleiner ist als der Betrag der elektroosmotischen Mobilität μ_{eo} , können alle Analyte detektiert werden, wobei die Migrationszeit der Mizellen das Elutionsfenster begrenzen. Dieser Elutionsmodus ($|\mu_{eo}| > |\mu_{MC}|$) wird als Normalmodus bezeichnet. Zur Ermittlung der Grenzen des Elutionsfensters werden zur Probe eine sehr polare und eine stark hydrophobe Substanz zugesetzt. Die polare Substanz wird sich nur in der wäßrigen mobilen Phase aufhalten und daher mit der Geschwindigkeit des EOF zum Detektor transportiert. Die gemessene Migrationszeit wird Durchflußzeit t_0 genannt.

Stark hydrophobe Substanzen halten sich überwiegend im Inneren der Mizellen auf und wandern mit deren Geschwindigkeit. Sie werden zum Zeitpunkt t_{MC} eluiert. Alle Substanzen (sofern $\mu_{ep} = 0$) werden zu einem Zeitpunkt zwischen t_0 und t_{MC} eluiert.

2.4 Chromatographische Kenngrößen

Der Trennmechanismus ungeladener Substanzen ist in der MEKC durch die Verteilung zwischen der mobilen wäßrigen und der pseudostationären mizellaren Phase charakterisiert. Ausgehend von chromatographischen Prinzipien entwickelte Terabe 1984 [7] eine für die MEKC in bezug auf die Bewegung der pseudostationären Phase angepaßte Formel zur Berechnung des Retentionsfaktors k (Gl.5). Der Retentionsfaktor k ist ein Maß für die Verteilung zwischen mobiler und pseudostationärer Phase (m in der stationären Phase/ m in der mobilen Phase). Dies bedeutet, je stärker der Analyt retardiert wird, desto größer ist sein k -Wert. Für die Annahme, daß die mizellare Phase als stationär anzusehen ist, wird die Größe t_{MC} unendlich und Gl.5 vereinfacht sich in die für die Chromatographie übliche (Gl.6).

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0 \cdot \left(1 - \frac{t_r}{t_{MC}}\right)} \quad (5)$$

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (6)$$

Der Retentionsfaktor k kann somit leicht durch die Ermittlung der Durchflußzeit t_0 , der Retentionszeit des Analyten t_R und der Migrationszeit der Mizellen t_{MC} errechnet werden. Ist die Verteilung nicht der alleinige Trennmechanismus, sondern tritt zusätzlich Elektrophorese auf bzw. besitzt der Analyt im elektrischen Feld eine Eigenmobilität μ_{ep} , kann der wahre Retentionsfaktor k nicht direkt aus den Daten eines Chromatogramms ermittelt werden. In der MEKC werden daher Pseudo-Retentionsfaktoren k^* , unter der Annahme, daß Gl.5 Gültigkeit besitzt, berechnet.

2 Grundlagen der Mizellaren Elektrokinetischen Chromatographie

Zur Trennung zweier Analyte müssen sich deren Werte für k^* hinreichend unterscheiden. Da die hohe Trennleistung der MEKC nicht wie in der HPLC auf großer Selektivität beruht, sondern auf den extrem hohen Trennstufenzahlen N , werden diese häufig zur Charakterisierung von mit der MEKC realisierten Trennungen herangezogen. Direkt aus chromatographischen Daten läßt sich die Trennstufenzahl N für einen Analyten nach Gl.7 berechnen.

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_r}{w_b} \right)^2 = 5,54 \cdot \left(\frac{t_r}{W_h} \right)^2 \quad (7)$$

w_b = Basispeakbreite

W_h = Peakbreite in halber Höhe

Die Anzahl der Trennstufen N ist ein Maß für die Effizienz des chromatographischen Systems. Je größer N , desto effizienter ist das System. In der vorliegenden Arbeit wird die Trennstufenzahl N direkt aus den zur Verfügung stehenden Daten der Retentionszeit t_r , der Peakhöhe H und der Peakfläche A berechnet (Gl.8).

$$N = 2\pi \cdot \frac{t_r^2 \cdot H^2}{A^2} \quad (8)$$

In der MEKC können sehr hohe Trenneffizienzen mit Trennstufenzahlen von $N > 300.000$ erreicht werden, so daß für eine Trennung schon geringe Unterschiede in k^* ausreichen. Als Maß für die Fähigkeit, ein Analytenpaar trennen zu können, wird der Selektivitätsfaktor α (Quotient der Retentionsfaktoren) herangezogen (Gl.9). Dieser Faktor ist identisch mit dem Quotienten der Verteilungskonstanten der Analyte zwischen [pseudo]stationärer und mobiler Phase.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (9)$$

2 Grundlagen der Mizellaren Elektrokinetischen Chromatographie

Die Güte einer Trennung wird durch die Auflösung R beschrieben. In der Praxis erfolgt die Bestimmung der Auflösung R direkt aus Daten des chromatographischen Laufes. So ergibt sich R aus dem Quotienten des Abstandes zweier benachbarter Peakmaxima und dem arithmetischen Mittel der beiden Basispeakbreiten w_b (Gl.10).

$$R = \frac{2 \cdot (t_{r,2} - t_{r,1})}{(w_{b,1} + w_{b,2})} \quad (10)$$

Durch Einsetzen der vorgenannten Gleichungen in Gl.10 wird Gl.11 erhalten.

$$R = \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left(\frac{k_2}{k_2 + 1} \right) \cdot \left(\frac{1 - \left(\frac{t_0}{t_{MC}} \right)}{1 + k_1 \cdot \left(\frac{t_0}{t_{MC}} \right)} \right) \quad (11)$$

Eine Verbesserung der Auflösung ist nach Gl.11 durch eine Optimierung in bezug auf die Trennstufenzahl N , die Selektivität α oder die Retentionsfaktoren k möglich. Die Retentionsfaktoren lassen sich durch Veränderung der Tensidkonzentration beeinflussen, da die Retentionsfaktoren direkt proportional zur Tensidkonzentration sind. Eine Verbesserung der Auflösung wird in der Praxis durch Variation der Konzentration des eingesetzten Tensids realisiert, häufiger aber durch direkte Beeinflussung des EOF (s. Kap. 2.3) und damit des Verhältnisses t_{MC}/t_0 .

Eine vollständige Basislinientrennung wird bei einem Wert von $R = 1,5$ realisiert, wobei größere Werte gleichbedeutend mit einer unnötigen Verlängerung der Analysenzeit sind. Für eine quantitative Auswertung ist sogar ein Wert von $R = 1,25$ schon ausreichend.

Die Anzahl der in einem chromatographischen Lauf maximal trennbaren Komponenten wird durch die Peakkapazität PK angegeben und ist durch die Tatsache, daß in der MEKC das Zeitfenster der Elution durch die Durchflußzeit t_0 und die Wanderungszeit der Mizellen t_{MC} begrenzt wird, beschränkt. Die Definition der PK geht auf GIDDINGS [10] zurück. PK läßt sich direkt aus N, t_0 und t_{MC} nach Gl.12 berechnen.

$$PK = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \ln \frac{t_{MC}}{t_0} \quad (12)$$

2.5 Das verwendete Kapillarelektrophorese-Gerät

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse wurden mit einem kommerziell erhältlichem CE-Gerät der Firma Beckman (P/ACE 2200-SERIE) erzielt. Die Abb.5 zeigt die wichtigsten Elemente einer CE-Apparatur in einer schematischen Zeichnung. Die Grundelemente der verwendeten CE-Apparatur sind die Hochspannungsquelle, zwei rotierende Probenhalter, die Trennkapillare und die Detektoreinheit. Ein Photo der verwendeten CE-Apparatur zeigt Abb. 6.

Die Hochspannungsquelle liefert eine Spannung bis 30 kV, die in 0,1 kV-Schritten geregelt werden kann. Der resultierende Stromfluß wird in Schritten von 0,1 μ A angezeigt, wobei bei 250 μ A das gerätetechnische Maximum erreicht ist.

Die beiden rotierenden Probenhalter, die über 24 bzw. 10 frei wählbare Positionen am Ein- bzw. Auslaß verfügen, erlauben eine automatisierte Probenaufgabe. Die Probenaufgabe kann wahlweise elektrokinetisch, d.h. durch kurzes Anlegen einer geringen Spannung oder hydrodynamisch, d.h. durch kurzzeitiges Erzeugen eines oberhalb des Umgebungsdrucks liegenden Drucks (0,5 psi = 0,034 bar) im Einlaßgefäß erfolgen.

2 Grundlagen der Mizellaren Elektrokinetischen Chromatographie

Zur Trennung werden polyimidbeschichtete Quarzglaskapillaren mit einem Innendurchmesser (I.D.) von 75 μm verwendet. Zur Herstellung des Detektionsfensters wird die Polyimidschicht auf einer Länge von 0,3 cm mittels einer Glühwendel thermisch entfernt. Die letztlich vom Detektorlicht durchstrahlte Fläche beträgt $100 \times 200 \mu\text{m}$. Die Trennkapillare wird in einer Kasette auf einer Schnecke aufgewickelt und kann während der Messung mit einem Kühlmittel, einem Fluorkohlenwasserstoff (FKW), gespült werden, so daß die entstehende JOULsche Wärme abgeführt wird und die Trennung bei einer konstanten Temperatur erfolgt. Die Temperatur der Kühlflüssigkeit läßt sich zwischen 15 und 50° C in 0,1° C-Schritten regulieren. Einzig 4 cm der Kapillare am Ein- und Auslaß werden nicht thermostatisiert.

Bei der Detektoreinheit handelt es sich um einen photometrischen Detektor, dessen Meßwellenlänge sich durch Wahl entsprechender Filter einstellen läßt. In dieser Arbeit wurde als Meßwellenlänge $\lambda = 254 \text{ nm}$ gewählt.

Die erhaltenen Meßdaten wurden von einem PC registriert und ausgewertet. Mit einer Auswertesoftware (System Gold) wurde gleichzeitig die Ansteuerung und Programmierung der gesamten CE-Apparatur durchgeführt.

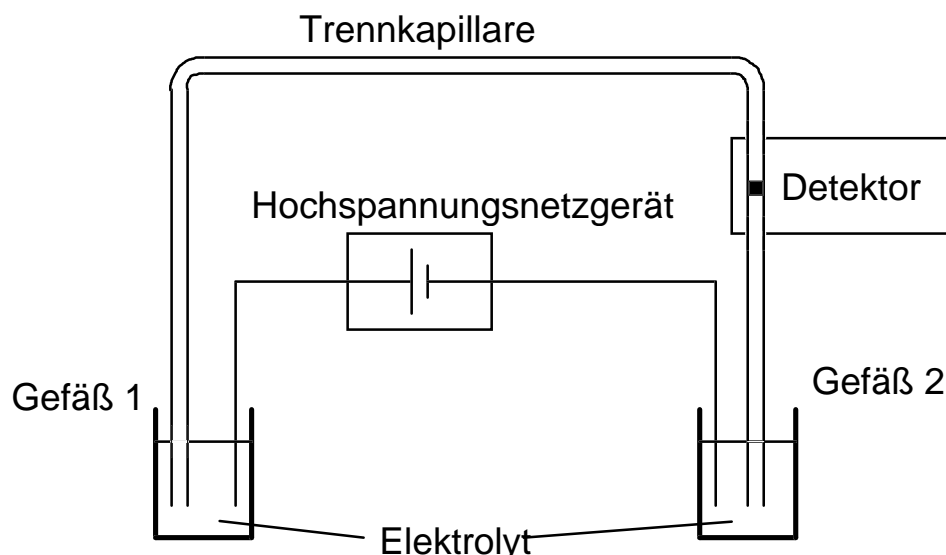


Abb.5: Schematische Zeichnung einer CE-Apparatur

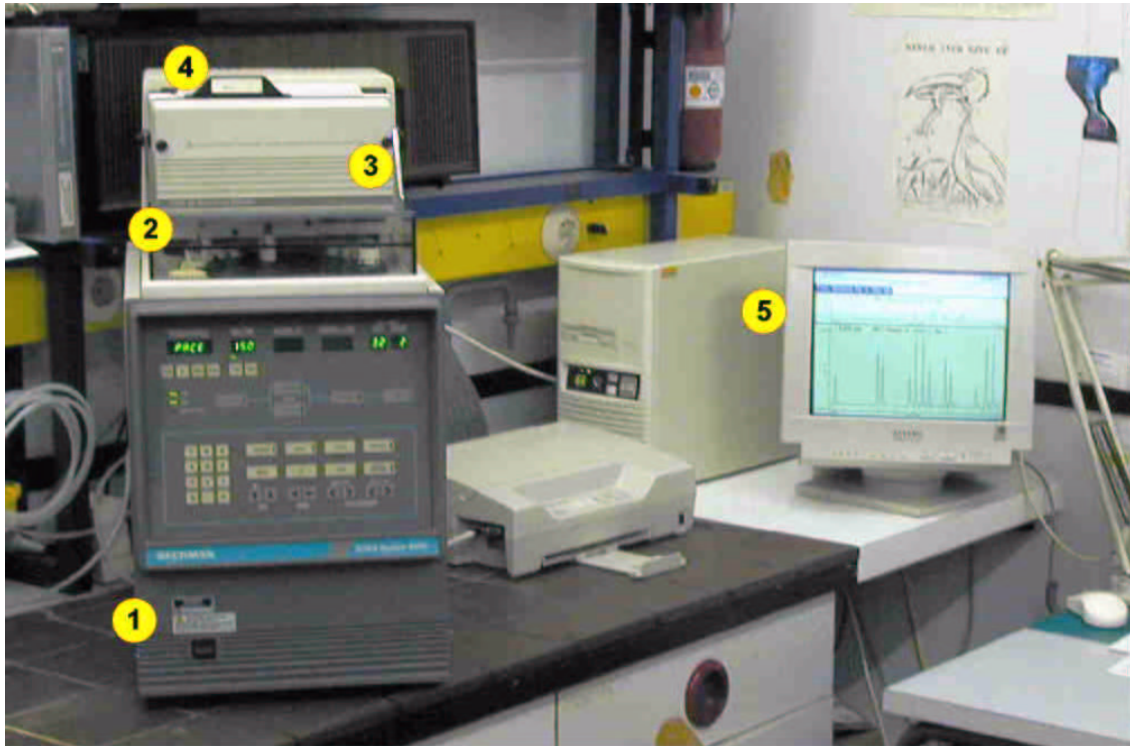


Abb. 6: Photo der verwendeten CE-Apparatur

(Zuordnung: 1 = CE-Apparatur, 2 = Probenhalter, 3 = Detektoreinheit, 4 = Kartusche für Trennkapillare, 5 = PC zur Datenaufnahme)

3 Einsatz kationischer Tenside

3.1 Einleitung

Seit Einführung der MEKC als neuer Trenntechnik wurden viele unterschiedliche Arten von Tensiden auf ihre Eignung als pseudostationäre Phase getestet. Gegenwärtig wird aber weiterhin überwiegend Natriumdodecylsulfat (SDS), das anionische Tensid, das bereits von TERABE et al. [7,8] in den grundlegenden Arbeiten zur MEKC verwendet wurde, eingesetzt. Neben den anionischen Tensiden sind noch kationische, amphotere und nichtionische Tenside bekannt. Allen Tensiden gemeinsam ist ein längerer unpolarer Alkyl- oder Arylrest und ein polarer, meist geladener, hydrophiler Rest. Anionische Tenside sind z.B. Salze langkettiger Carbonsäuren und kationische Tenside sind z.B. Salze quartärer Ammoniumverbindungen. Amphotere Tenside tragen sowohl positive als auch negative Ladungen und können je nach pH-Wert als Zwitterion oder positiv bzw. negativ geladen auftreten. Die nichtionischen Tenside tragen nur ungeladene Gruppen und können aufgrund fehlender elektrophoretischer Mobilität in der MEKC alleine nicht eingesetzt werden. Nichtionische Tenside werden in der MEKC zu Trennelektrolyten, die einen geladenen Mizellenbildner enthalten, zugesetzt, um durch die Bildung von Mischmizellen Trennprobleme zu lösen.

Der erste Bericht über den Einsatz kationischer Tenside geht auf OTSUKA et al. [11] aus dem Jahre 1985 zurück. Sie setzten Dodecyltrimethylammoniumbromid zur Trennung derivatisierter Aminosäuren ein. Ein wichtiges Ergebnis ihrer Arbeit ist, daß in der MEKC die Art des verwendeten Tensids einen Einfluß auf die Selektivität besitzt. CROSBY und EL RASSI [12] verglichen homologe Reihen von Alkytrimethylammoniumchloriden und -bromiden hinsichtlich der mit diesen Tensiden erreichbaren Trennungen. Sie stellten fest, daß die Selektivität des Trennsystems innerhalb einer homologen Reihe von Tensiden unabhängig von der Länge des Alkylrestes ist.

In unseren Untersuchungen haben wir die homologe Reihe der kationischen Tenside Dodecyltrimethylammoniumbromid (DoTAB), Tetradecyltrimethylammoniumbromid (TTAB) und Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) (Abb.7) auf ihre Einsatzmöglichkeiten in der MEKC geprüft. Die vorgenannten Tenside unterscheiden sich nur in der Länge ihres Alkylkettenrestes (C_{12} , C_{14} , C_{16}).

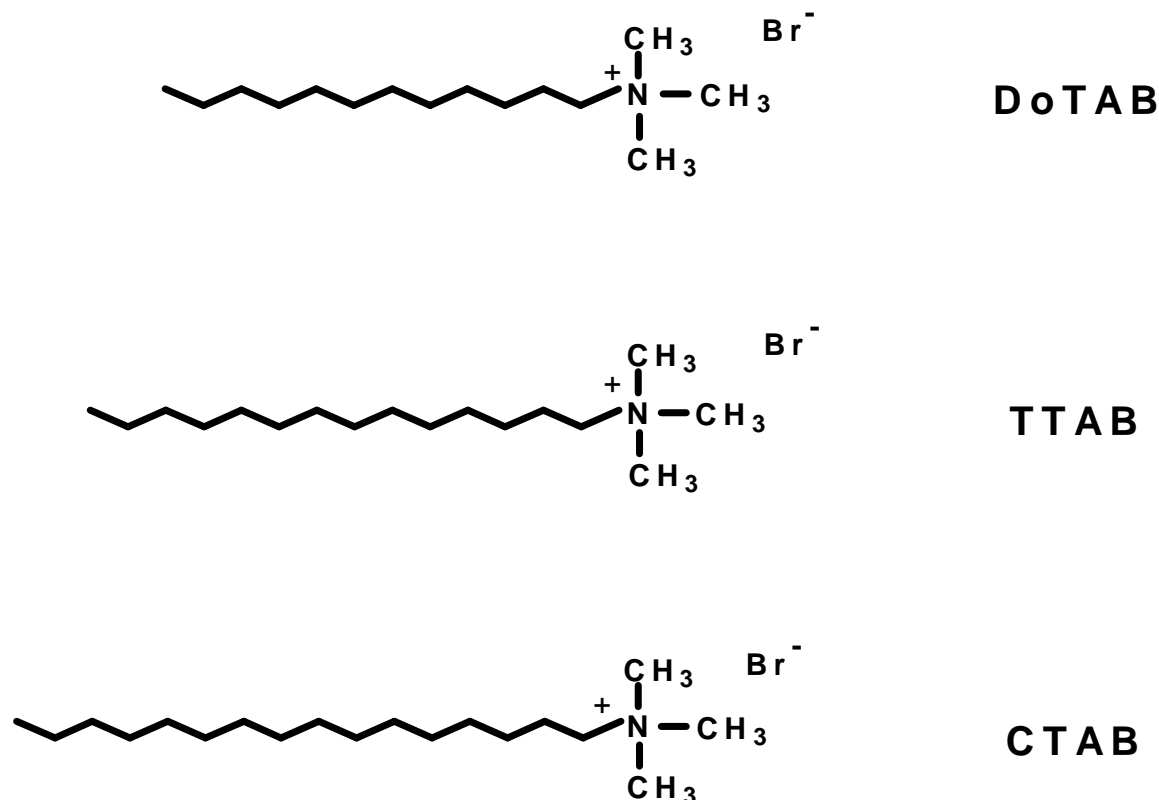


Abb.7: In die Untersuchungen einbezogene kationische Tenside

3.2 Umkehr des elektroosmotischen Flusses (EOF) durch kationische Tenside

Kationische Tenside wechselwirken mit den dissoziierten, negativ geladenen Silanol-Gruppen der Kapillareninnenwand. Sind alle Silanol-Gruppen abgesättigt, ist die Mobilität des elektroosmotischen Flusses (EOF) gleich Null. Bei einer weiteren Erhöhung der Tensidkonzentration bildet sich eine Doppelschicht aus, wobei sich die langen Alkylreste aneinanderlagern und der positiv geladene Kopf in die wässrige Lösung ragt.

Bei der Ausbildung der Doppelschicht wird somit eine positive Überschußladung erzeugt, und diese führt zu einer Umkehr der Richtung des EOF (Abb.8). Daher muß bei Einsatz von kationischem Tensid als Mizellenbildner in der MEKC die Polarität der Elektroden im Vergleich zu Messungen mit anionischen Mizellenbildnern umgekehrt werden. Die Probenaufgabe erfolgt bei Verwendung kationischer Tenside am kathodischen Ende der Kapillare und die Detektion am anodischen Ende.

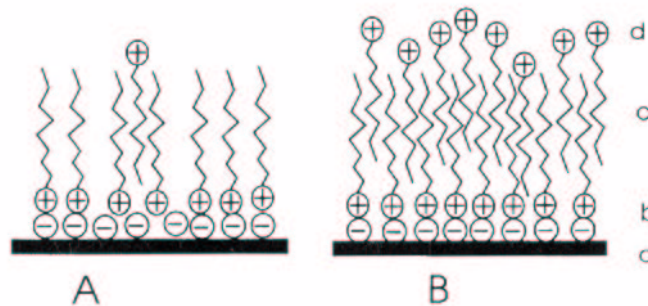


Abb.8: Adsorption von kationischen Tensiden an der Kapillarinnenwand

A = Einfache Tensidschicht; B = Tensiddoppelschicht

(a) Quarzwand mit negativen Silanolgruppen

(b) COULOMB-Wechselwirkung des positiven Tensidendes

(c) hydrophobe Region

(d) positive Überschußladung

3.3 Auswahlkriterien für den Einsatz von Tensiden in der MEKC

Tenside, die in der MEKC eingesetzt werden, müssen folgende Kriterien erfüllen:

- niedrige kritische mizellare Konzentration (CMC)
- gute Löslichkeit in wäßrigen Puffermedien
- niedriger KRAFFT-Punkt

3.3.1 Kritische Mizellare Konzentration (CMC)

Es ist bekannt, daß die kritische Mizellare Konzentration (CMC) von ionischen Tensiden in Puffermedien sich deutlich von der in Wasser gemessenen unterscheidet [13 und 14]. Die Ermittlung der CMC muß daher bei Pufferkonzentrationen erfolgen, die bei MEKC-Messungen üblich sind. Als Puffer dienen 1:1-Mischungen von Natriumtetraborat/Borsäure (pH 9), Tris(hydroxymethyl)aminomethan/Salzsäure (pH 7) und Essigsäure/Natriumacetat (pH 4,6).

Zur Bestimmung der CMC für die von uns eingesetzten kationischen Tenside wurden photometrische und konduktometrische Bestimmungen durchgeführt. Bei der photometrischen Bestimmung wird zu Pufferlösungen mit unterschiedlichem Gehalt an Tensid eine feste Substanz (hier Anthracen), die photometrisch erfaßt werden kann und die in wäßrigen Pufferlösungen nahezu unlöslich ist, zugesetzt. Bei Überschreitung der CMC wird das Anthracen durch Inkorporation in die Mizellen gelöst und die Lösungen weisen mit steigender Tensidkonzentration eine linear ansteigende Extinktion auf (Abb.9).

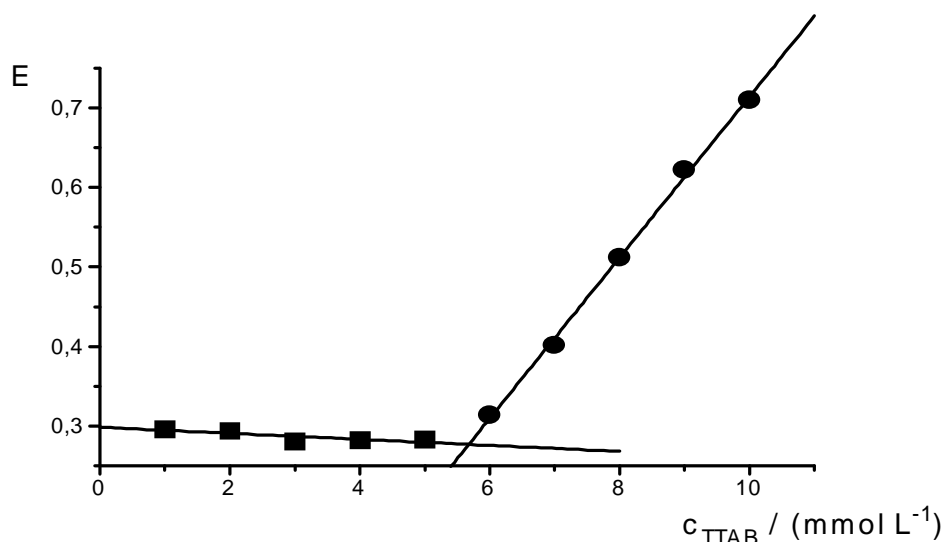


Abb.9: Photometrische Ermittlung der CMC von TTAB

(Meßbedingungen: $c(\text{H}_3\text{BO}_3) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7) = 10 \text{ mmol/L}$, pH: 9,0; Zusatz: Anthracen; Wellenlänge: 240 nm; Temperatur: 21-23° C; optische Schichtdicke: 10 mm; Spaltbreite: 0,6 mm)

Bei der konduktometrischen Bestimmung der CMC werden zu einer wässrigen Pufferlösung definierte Stoffmengen Tensid in geringen Volumina zugesetzt. Bei den Zugaben sollte anfänglich eine Erhöhung der Leitfähigkeit zu beobachten sein, die nach Überschreiten der CMC und Ausbildung der Mizellen in einen wesentlich geringeren Anstieg der Leitfähigkeit übergeht (Abb.10). Dieser geringere Anstieg der Leitfähigkeit mit zunehmender Gesamtkonzentration resultiert aus der geringeren elektrophoretischen Mobilität der Mizellen gegenüber der elektrophoretischen Mobilität des Tensid-Monomers (Gl.13 und 14).

$$G = \frac{1}{x} \cdot \kappa \quad (13)$$

$$\kappa = F \cdot (u_A + u_K) \cdot c \cdot z \quad (14)$$

G = Leitwert

x = Zellkonstante

κ = Spezifische Leitfähigkeit

F = Faraday-Konstante

c = Tensidkonzentration

z = Ionenladung

u_A, u_K = Mobilität des Anions bzw. Kations

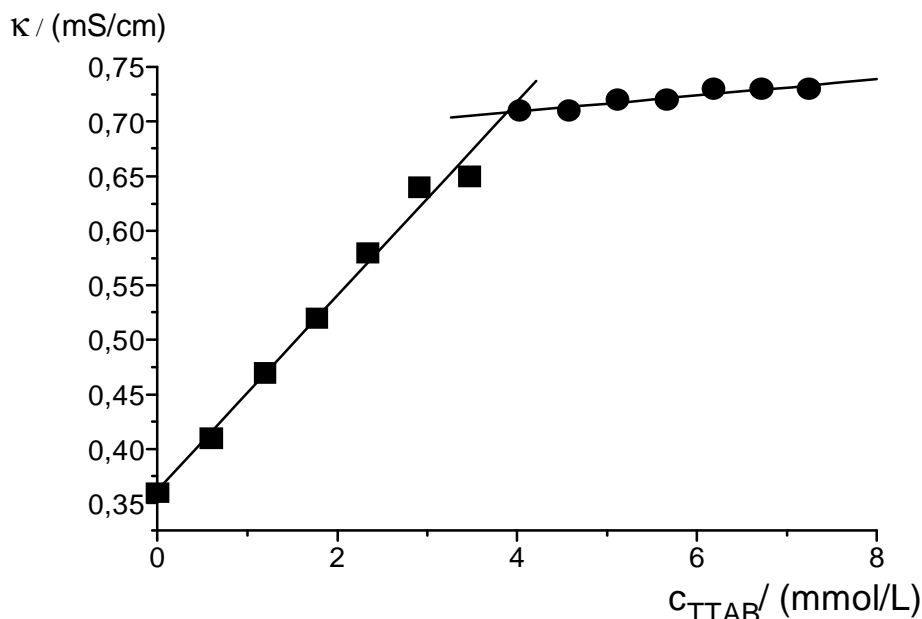


Abb.10: Konduktometrische Ermittlung der CMC von TTAB

(Meßbedingungen: $c(\text{H}_3\text{BO}_3) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7) = 10 \text{ mmol/L}$, pH 9,0; Temperatur: 21-23° C; Elektrode: Platin-Doppelblech-Elektrode; Zellkonstante mit KCl-Lösung ermittelt)

Bei der photometrischen Bestimmung der CMC wurde zu den Tensid enthaltenden Pufferlösungen eine Spatelspitze Anthracen gegeben, geschüttelt und über Nacht stehen gelassen, so daß der Gleichgewichtszustand erreicht werden konnte. Die filtrierten Lösungen wurden am nächsten Tag bei einer Wellenlänge von $\lambda = 240 \text{ nm}$ photometrisch vermessen. Nach dem Auftragen der bei RT (21-23° C) gemessenen Extinktion gegen die Tensidkonzentration wurden zwei Geraden ermittelt. Nach Bestimmung des Schnittpunktes wurde durch Fällen des Lots auf die Konzentrationsachse die resultierende CMC ermittelt.

Anders als theoretisch erwartet, wurde bei den photometrischen Messungen häufig, vor allem bei Verwendung von DoTAB als Mizellenbildner, kein eindeutiger Kurvenverlauf beobachtet, so daß eine Bestimmung des Schnittpunktes und damit der CMC nicht möglich war.

Bei der konduktometrischen Bestimmung der CMC wurde die nach jeder Zugabe von Tensidstammlösung (wenige μL) die bei 22,5° C gemessene Leitfähigkeit gegen die Tensidkonzentration aufgetragen. Mittels eines Computerprogramms wurden die Koordinaten des Schnittpunktes der beiden resultierenden Geraden unterschiedlicher Steigung ermittelt.

In Tab.2 sind die Mittelwerte für die CMC aus zwei konduktometrischen Bestimmungen für die drei verschiedenen pH-Werte 9,0, 7,0 und 4,6 vergleichend angegeben. Zusätzlich sind in Klammern die Werte der CMC mit angegeben, die durch photometrische Bestimmung ermittelt werden konnten. Die Herstellung der, bei der Bestimmung der CMC, eingesetzten Puffer ist in Tab.3 wiedergegeben.

Wie erwartet, ist mit zunehmender Alkylkettenlänge eine deutliche Abnahme der CMC zu beobachten. Die Ursache für diese Tendenz liegt darin begründet, daß bei der Bildung der Mizellen zwei gegensätzliche Kräfte wirksam sind. Zum einen ist es die elektrostatische Abstoßung der polaren Gruppen, die der Mizellenbildung entgegenwirkt und bei kurzkettigen Tensiden deutlich größer ist als bei längerkettigen. Zum anderen ist es der Gewinn an freier Enthalpie durch die VAN-DER-WAALS-Wechselwirkungen zwischen den lipophilen Gruppen bzw. durch die Vermeidung hydrophober Wechselwirkungen der lipophilen Enden mit dem polaren Lösungsmittel.

Die Ergebnisse zeigen, daß nicht in allen Fällen eine Abnahme der CMC im Vergleich zum Literaturwert zu beobachten ist. Die CMC von TTAB liegt bei allen pH-Werten in einer für SDS üblichen Größenordnung. Für SDS wird bei 20° C in einem Phosphat/Borat-Puffer ($c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7) = 10 \text{ mmol/L}$) eine CMC von 3,0 mmol/L [14] ermittelt.

Die CMC von CTAB ist um etwa eine Größenordnung kleiner als die CMC von TTAB, während für DoTAB die CMC deutlich oberhalb von 10 mmol/L liegt. Eine hohe CMC wie im Falle von DoTAB macht dieses Tensid aufgrund der hohen Konzentration an freien geladenen Monomeren und der daraus resultierenden hohen spezifischen Leitfähigkeit ungeeignet für den Einsatz als Mizellenbildner in der MEKC.

Tab.2: Die konduktometrisch (photometrisch) durch Doppelbestimmung ermittelten Werte für die CMC (mmol/L) der getesteten kationischen Tenside bei drei verschiedenen pH-Werten

Tensid	pH 9,0	pH 7,0	pH 4,6	Lit ^a
DoTAB	14	13	16	16
TTAB	3,8 (5,5)	3,1 (3,0)	3,5 (3,5)	3,6
CTAB	0,75 (0,74)	0,40	0,37	0,92

^a Die angegebenen Literaturdaten wurden in Wasser bei 25° C ermittelt [15]

3.3.2 Löslichkeit

Die Löslichkeit der verwendeten kationischen Tenside weist gegenüber der CMC einen gegenläufigen Effekt auf. Mit zunehmender Alkylkettenlänge wird die Löslichkeit in wäßrigen Puffer-Lösungen deutlich geringer. Nach Herstellerangaben beträgt die Löslichkeit für CTAB bei 20° C in reinem Wasser 9 mmol/L. Um die in der MEKC üblicherweise eingesetzten Konzentration von 20 bis 100 mmol/L an CTAB zu lösen, müßte bei einer Temperatur oberhalb von 30° C gearbeitet werden. Apparativ stellt dies kein Problem dar, da die Kapillare bis auf 50° C temperiert werden kann, aber die Handhabung der Pufferlösungen außerhalb der Kapillare gestaltet sich als schwierig, vor allem im Hinblick auf einen Einsatz im Routinelabor.

3.3.3 KRAFFT-Punkt

Der KRAFFT-Punkt [16] stellt die Temperatur dar, ab der die Löslichkeit ionischer Tenside höher ist als die CMC, d.h. unterhalb dieser Temperatur ist keine Mizellenbildung möglich. Diese Temperatur liegt für den Einsatz von CTAB als Mizellenbildner mit $T > 30^{\circ}\text{C}$ sehr hoch.

Aus den erhaltenen physiko-chemischen Daten wurde TTAB als das für den Einsatz als Mizellenbildner in der MEKC geeignetste Tensid ausgewählt. Gegen den Einsatz von DoTAB spricht seine hohe CMC, gegen CTAB spricht seine geringe Löslichkeit in wässrigen Puffern bei Raumtemperatur.

3.4 Wirkende Trennmechanismen in der MEKC

In der MEKC existiert durch die Anwesenheit von Mizellen im Trennmedium und die Anwendung hoher elektrischer Feldstärken eine größere Bandbreite an möglichen Wechselwirkungen, die die Trennung beeinflussen, als in der konventionellen Chromatographie. Unpolare bis schwach polare Analyte können mit dem hydrophoben Innenbereich der Mizelle dispersiv oder durch induzierte Dipole wechselwirken. Polare Analyte können mit der polaren Außenhülle der Mizellen unter Dipol-Dipol-Wechselwirkungen interagieren. Amphivalente Analyte wie organische Moleküle, die eine basische oder saure funktionelle Gruppe tragen, können sowohl dispersiv mit dem hydrophoben Innenbereich als auch elektrostatisch mit der polaren Außenhülle der Mizelle wechselwirken. Starke Coulomb-Wechselwirkungen sind bei geladenen Analyten mit den ebenfalls geladenen Köpfen auf der Oberfläche der Mizellen denkbar.

In Abb.11 sind mögliche Wechselwirkungen (WW) von anionischen und kationischen Tensiden mit aciden Analyten dargestellt. Je nach pH-Wert liegt der acide Analyt in der protonierten (HA) oder deprotonierten (A^-) Form vor.

Mit anionischen Tensiden als mizellenbildenden Pufferbestandteil ist praktisch nur die WW ($K_{\text{mw,HA}}$) zwischen Mizellen und dem protonierten Analyt zu erwarten. Eine WW ($K_{\text{mw,A}}$) der negativ geladenen Mizellen mit den deprotonierten und ebenfalls negativ geladenen Analyten kann ausgeschlossen werden.

Beim Einsatz von kationischen Tensiden als mizellenbildendem Pufferbestandteil sind gegenüber dem Einsatz anionischer Tenside weitere WW denkbar. Zusätzlich zur WW ($K_{mw,HA}$) zwischen Mizelle und protonierter Form des Analyten (HA), kann auch eine WW ($K_{mw,A}$) mit der negativ geladenen deprotonierten Form (A^-) postuliert werden. Außerdem wird in der Literatur auch die Bildung von Ionenpaaren (K_{IP}) zwischen kationischen Tensid-Monomeren und dem deprotonierten Analyt diskutiert [17,18].

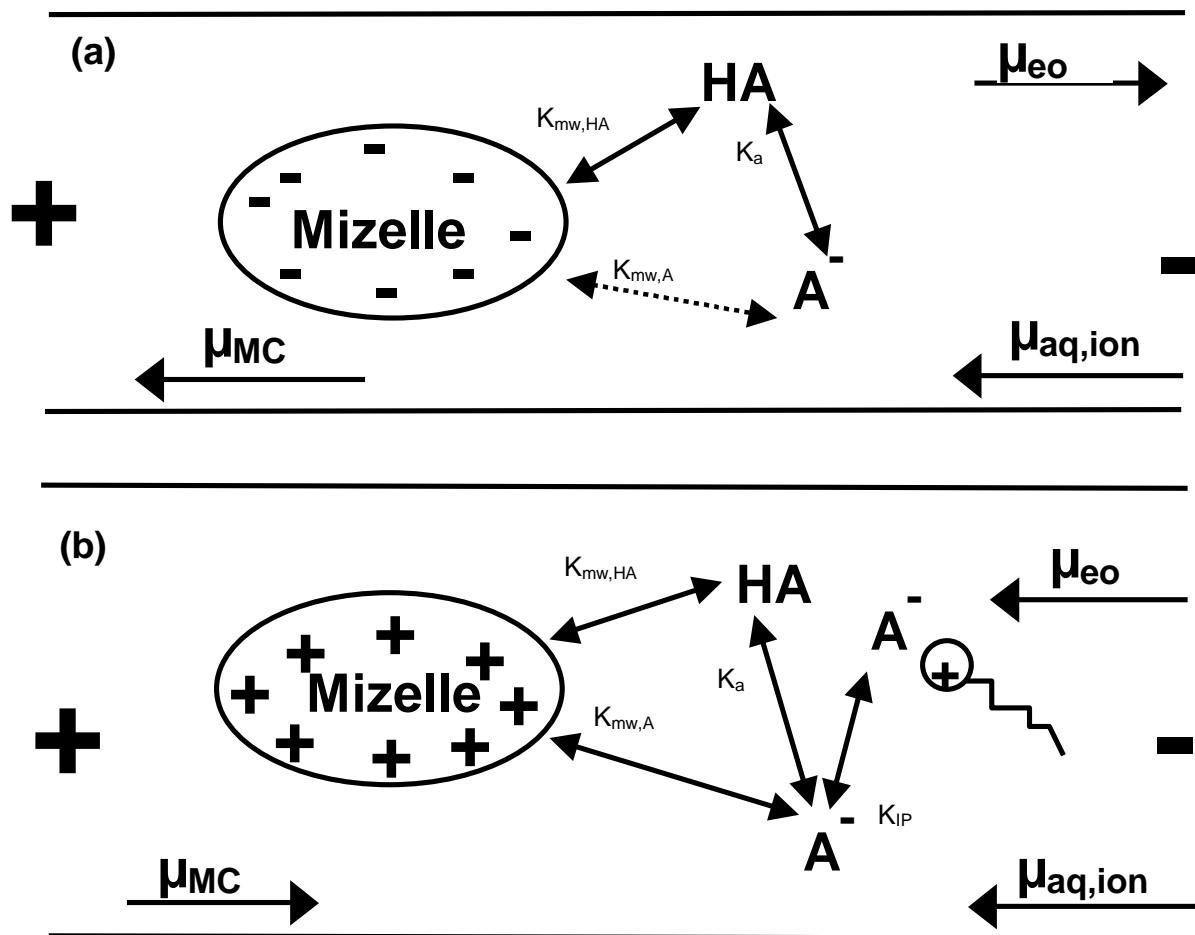


Abb.11: Mögliche Wechselwirkungen von anionischen (a) und kationischen (b) Tensiden bzw. deren Mizellen mit acidischen Analyten

μ_{eo} = Richtung der elektroosmotischen Mobilität

μ_{MC} = Richtung der elektrophoretischen Mobilität der Mizellen

$\mu_{aq,ion}$ = Richtung der elektrophoretischen Mobilität der Ionen

K_a = Dissoziationskonstante

K_{IP} = Ionenpaar-Bildungskonstante

$K_{mw,HA}$; $K_{mw,A}$ = Verteilungskonstante zwischen Mizelle und Analytspezies

3.5 Anwendung von kationischen Tensiden zur Trennung von Vanille-Bestandteilen

Als Anwendungsbeispiel für die vorteilhafte Verwendung kationischer Tenside in der MEKC wurde die Trennung natürlicher Bestandteile der Vanille und möglicher verfälschender Zusätze ausgewählt. Die Auswahl der Analyte erfolgte aus dem Gesichtspunkt heraus, daß sowohl geladene wie ungeladene bzw. sowohl acide als auch neutrale Analyte zu trennen sind. Somit ist es möglich, Aussagen über das Auftreten oder Ausbleiben der in Kap.3.4 postulierten Wechselwirkungen zu machen.

Bei den im Handel erhältlichen Vanilleschoten handelt es sich um die getrockneten, unreifen Früchte einer Pflanze aus der Gattung der Orchideen, die in den feuchtheißen Regionen der Tropen angebaut wird. Die getrockneten gelblich grünen Schoten und der aus ihnen gewonnene ethanolische Extrakt finden in der Industrie vielfältige Verwendung.

Eine Analyse von Vanille-Extrakten erweist sich als sehr komplex, so daß in den meisten Fällen auf eine komplette Charakterisierung verzichtet wird und auf eine Bestimmung des Konzentrationsverhältnisses von 4-Hydroxybenzaldehyd, 4-Hydroxybenzoesäure und Vanillinsäure zum Hauptbestandteil 3-Methoxy-4-hydroxybenzaldehyd (Vanillin) zurückgegriffen wird [19], wobei die absoluten Konzentrationen keine Rolle spielen. Mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) sind heute über 170 flüchtige organische Verbindungen als Inhaltsstoffe der Vanille identifiziert worden [20].

Der hohe Preis für authentische Vanille-Extrakte hat zur Folge, daß häufig billigere Produkte anstelle von natürlicher Vanille zur Aromatisierung eingesetzt werden. Am häufigsten wird dabei reines Vanillin, das kostengünstig aus Lignin gewonnen werden kann, verwendet. Mehrere Fälle der illegalen Imitation authentischer Extrakte sind bekannt geworden. Ethylvanillin, Cumarin und Piperonal sind als imitierende Zusätze bekannt.

Winkler und Schmidt erkannten 1980 [21], daß zur Unterscheidung zwischen synthetischem und natürlichem Vanillin und damit der Prüfung der Authentizität von Vanillearomen eine Kontrolle mit Massenspektrometrie möglich ist, da natürliches Vanillin mit ^{13}C angereichert ist.

Zusätzlich ist natürliches Vanillin gegenüber synthetischem mit Deuterium angereichert, so daß auch eine Unterscheidung durch ^2H -NMR-Spektroskopie möglich ist [22].

In unsere Untersuchungen haben wir die 9 häufigsten Bestandteile natürlicher Vanille-Extrakte und drei potentielle synthetische, verfälschende Zusätze miteinbezogen (Abb.12).

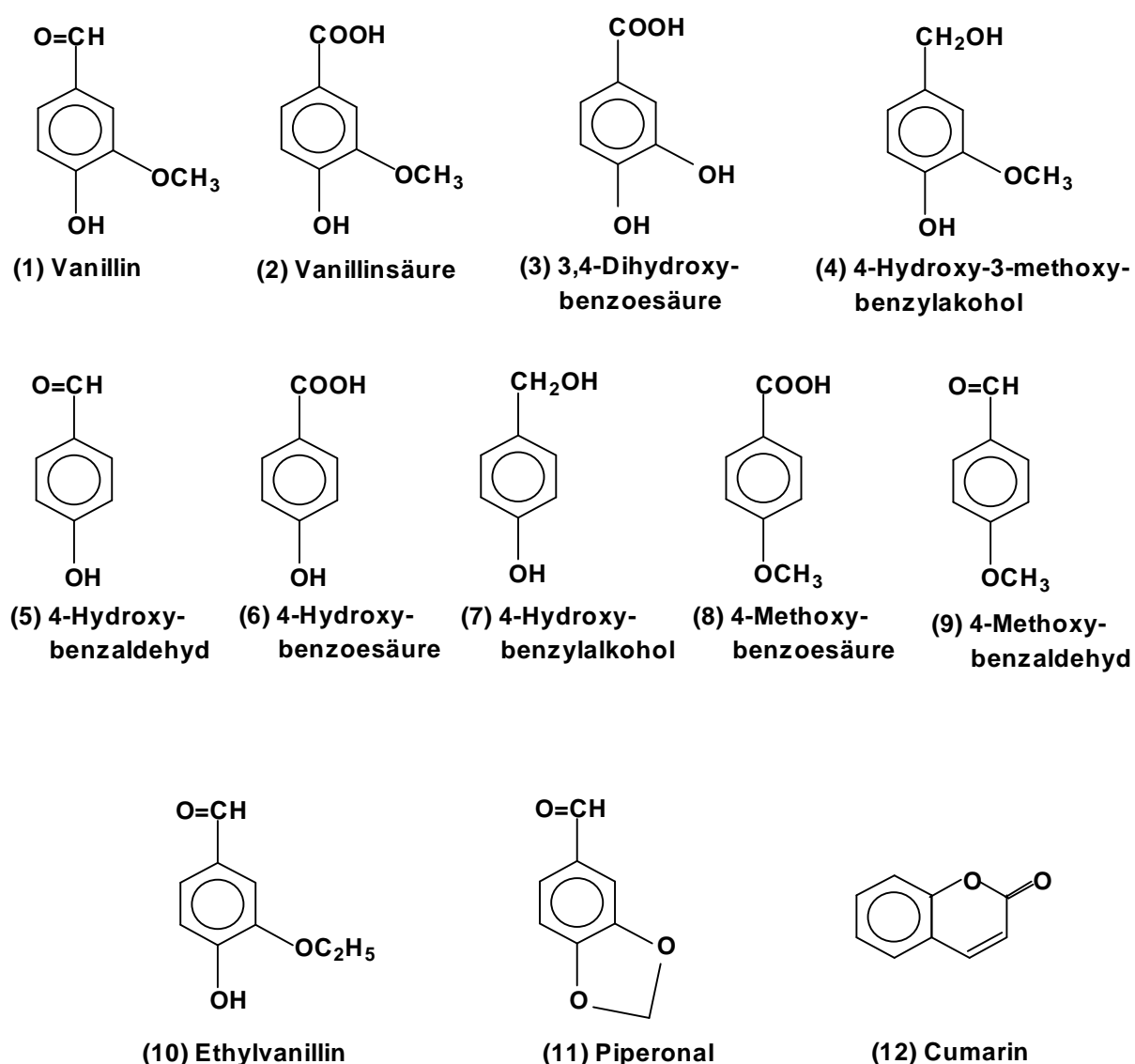


Abb.12: In die Untersuchungen einbezogene Vanille-Inhaltsstoffe (1-9) und drei potentielle verfälschende Zusätze (10-12)

4 Variation der Zusammensetzung des Trennelektrolyten

4.1 Spülprozedur

Als problematisch erwies sich bei Verwendung kationischer Tenside die Wiederholpräzision aufeinanderfolgender Messungen, sowie die Wiederholbarkeit von einem Tag zum nächsten. Bei Verwendung von SDS als Mizellenbildner ist es ausreichend, zwischen den Messungen für 0,5 min mit bidestilliertem Wasser und anschließend für 1,5 min mit Trennpuffer zu spülen. Am Ende eines Arbeitstages wird die Kapillare durch 20-minütiges Spülen mit bidestilliertem Wasser gereinigt und abschließend durch Hindurchleiten von Luft getrocknet.

Bei Trennelektrolyten, die ein kationisches Tensid enthalten, ist die Reinigung der Kapillare aufgrund der Ausbildung der adsorbierten Doppelschicht an der Kapillareninnenwand schwieriger und erfordert daher drastischere Spülprozeduren. Gemäß den Untersuchungen von D. E. BURTON et al. [23] ist es ausreichend, die Kapillare nach jeder Messung mit Salzsäure (0,1 mol/L) zu spülen. Auch in unseren Messungen erwies sich das Spülen mit verdünnter Salzsäure als die am besten geeignete Spülprozedur. Zwischen den Messungen wird die Kapillare mit Salzsäure (0,1 mol/L) gespült und dann für 1,5 min mit Trennpuffer konditioniert. Am Ende eines Arbeitstages durfte die Kapillare nicht getrocknet werden, sondern mußte mit Salzsäure (1 mol/L) gereinigt und dann mit bidestilliertem Wasser gefüllt gelagert werden. Somit wurde am Ende eines Tages für 10 min mit Salzsäure (1 mol/L) und 20 min mit bidestilliertem Wasser gespült. Diese Spülprozeduren wurden bei allen durchgeführten Messreihen in dieser Arbeit beibehalten.

Die Ergebnisse für die Wiederholpräzision bei Verwendung kationischer Tenside sind in Kap.6 vergleichend denen von SDS sowohl für Standard- als auch für Realproben gegenübergestellt.

4.2 Bestimmung charakteristischer Größen

Zur Untersuchung der Einsetzbarkeit der kationischen Tenside Dodecyltrimethylammoniumbromid (DoTAB), Tetradecyltrimethylammoniumbromid (TTAB) und Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) in der MEKC wurden Konzentrationsreihen von 20 bis 100 mmol/L Tensid in 10 mmol/L-Schritten aufgenommen. Für jede Messung wurde das Retentionsfenster t_w aus der Differenz der Migrationszeit der Mizellen t_{MC} und der Durchflußzeit t_0 ermittelt. In der Literatur wird zur Beschreibung der Trennleistung eines Systems der Quotient t_{MC}/t_0 angegeben. Durch diesen Quotienten t_{MC}/t_0 kann bei gleichgroßem Retentionsfenster der Nachteil einer hohen Durchflußzeit t_0 und damit höherer Analysenzeiten deutlich gemacht werden. Als Marker für die Durchflußzeit t_0 wurde Thioharnstoff und zur Bestimmung der Migrationszeit der Mizellen t_{MC} Sudan III (Benzolazo-4-benzolazo-1-(2-naphthol)) (Abb.13) eingesetzt. Ausgehend von den gemessenen Retentionszeiten wurden die entsprechenden Mobilitäten nach Gl.15 berechnet.

$$\mu = \frac{L_{ges} \cdot L_{eff}}{U \cdot t_r} \quad (15)$$

μ_a = beobachtbare Mobilität

L_{ges} = Gesamte Kapillarlänge

L_{eff} = Kapillarlänge bis Detektor

U = Trennungsspannung

t_r = Retentionszeit

Bei der nach Gl.15 berechneten Mobilität μ_a handelt es sich um die beobachtete Mobilität, da der effektiven elektrophoretischen Mobilität μ_{ep} der Analyte immer die elektroosmotische Mobilität μ_{eo} überlagert ist. Die elektrophoretische Mobilität der Analyte μ_{ep} ergibt sich somit aus der Differenz der beobachteten Mobilität μ_a und der elektroosmotischen Mobilität μ_{eo} (Gl.16).

$$\mu_{ep} = \mu_a - \mu_{eo} \quad (16)$$

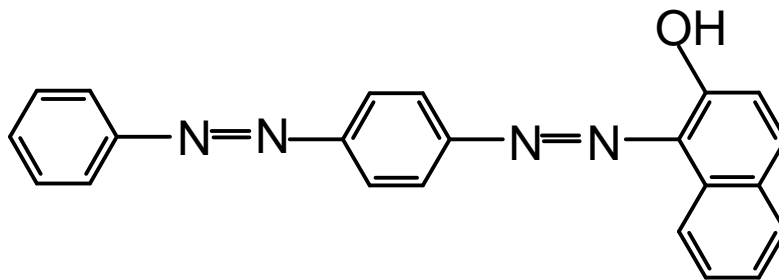


Abb.13: Struktur des Mizellen-Markers SUDAN III

4.3 Variation des pH-Werts

Bei der Diskussion zur Entstehung des elektroosmotischen Flusses (Kap.2.3) ist der drastische Einfluß des pH-Wertes auf die elektroosmotische Mobilität μ_{eo} bei Verwendung anionischer Tenside als Mizellenbildner deutlich geworden (Abb.3). Da die Mobilität der Mizellen μ_{MC} für ein gegebenes Tensid nahezu unabhängig vom pH-Wert des Trennelektrolyten ist [24], sollte die Verringerung von μ_{eo} bei einer pH-Wert Erniedrigung direkt zu einer Vergrößerung des Retentionsfensters führen.

Die drastische Reduktion der elektroosmotischen Mobilität μ_{eo} mit Erniedrigung des pH-Wertes ist in der MEKC für die Verwendung anionischer Tenside als mizellenbildendem Pufferbestandteil bekannt [25]. K. OTSUKA und S. TERABE [24] zeigten, daß bei einem pH-Wert um 5 die Geschwindigkeit des EOF so stark reduziert ist, daß sie im Betrag geringer ist als die Geschwindigkeit der Mizellen. In diesem Fall ist die Wanderungsrichtung der Mizellen umgekehrt und MEKC kann nicht mehr im Normalmodus betrieben werden. Mit Natriumdodecylsulfat (SDS) wird daher üblicherweise bei einem pH-Wert größer 8,0 gearbeitet. H.T. Rasmussen und H.M. McNair zeigten am Beispiel der Trennung von Alkyl-Parabene den Effekt der Umkehrphasen-MEKC bei einem pH-Wert von 3,37 im Vergleich zur Trennung im Normalmodus [26].

Bei Anwendung eines kationischen Tensids als Mizellenbildner ist bis zu einer Erniedrigung des pH-Wertes auf 4,6 nur eine geringe Abnahme von μ_{eo} festzustellen. Erst bei einem pH-Wert $< 4,6$ ist die Abnahme von μ_{eo} drastisch, und es kommt zu Bandenverbreiterung.

Somit kann mit kationischen Tensiden auch bei niedrigem pH-Werten MEKC im Normal-Modus betrieben werden. Um den Einfluß des pH-Wertes zu dokumentieren, erfolgen die durchgeführten Messungen an den Extremen des gewählten pH-Bereichs bei pH 9,0 und 4,6, sowie im neutralen bei pH 7,0. Die Zusammensetzung der eingesetzten Trennelektrolyten ist in Tab.3 aufgelistet. Die Puffer wurden dahingehend ausgewählt, daß sie aufgrund des 1:1 Konzentrationsverhältnisses der Pufferkomponenten die maximale Pufferkapazität besitzen.

Tab.3: Übersicht über die Herstellung der verwendeten Trennelektrolyten

pH-Wert	Pufferkomponenten	Pufferzusammensetzung
9,0	Borsäure / Borax	$c(\text{H}_3\text{BO}_3) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7) = 10 \text{ mmol/L}$
7,0	Tris(hydroxymethyl)aminomethan / Salzsäure	$c(\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3) = 16 \text{ mmol/L}$, $c(\text{HCl}) = 16 \text{ mmol/L}$
4,6	Essigsäure / Acetat	$c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(\text{CH}_3\text{COONa}) = 10 \text{ mmol/L}$

In Tab.4 sind für drei verschiedene Konzentrationen an kationischem Tensid bei den pH-Werten 9,0, 7,0 und 4,6 die elektroosmotische Mobilität μ_{eo} , die elektrophoretische Mobilität der Mizellen μ_{MC} und der Quotient t_{MC}/t_0 wiedergegeben. Die Abnahme von μ_{eo} mit abnehmenden pH-Wert und steigender Tensidkonzentration führt zu einer geringen Aufweitung des Retentionsfensters bzw. zu einer geringen Verbesserung des Quotienten t_{MC}/t_0 . So vergrößert sich der Quotient t_{MC}/t_0 bei $c_{TTAB} = 100 \text{ mmol/L}$ von 2,5 (pH 9,0) auf 3,0 (pH 4,6).

Mit kationischen Tensiden lassen sich in der MEKC mittels Variation des pH-Werts Selektivitäten erreichen, die mit SDS nicht möglich sind. Für eine Mischung acider und basischer Analyte mit unterschiedlichen pK_S -Werten beeinflusst der Wechsel des pH-Wertes die Analyte unterschiedlich.

Da die Analyte je nach pH-Wert des Trennelektrolyten geladen oder ungeladen vorliegen, besitzen sie eine unterschiedliche Affinität zur kationischen Mizelle und damit eine unterschiedliche effektive elektrophoretische Mobilität, dies führt zu einer Veränderung der Elutionsreihenfolge. Ein Beispiel dafür ist die Trennung der Vanilleinhaltsstoffe bei pH 9,0 (Abb.14a) und pH 4,6 (Abb.14b). Der Vorteil bei Verwendung kationischer Tenside als Mizellenbildner liegt also darin, daß die große Spannbreite des pH-Werts (4,6 bis 9,0) zur Optimierung einer Trennung genutzt werden kann.

Die Ergebnisse decken sich mit denen von CROSBY und EL RASSI [12], die für Alkyltrimethylchloride und -bromide in einem pH-Bereich von 4,5 bis 9,0 die Größe des Retentionsfensters als vom pH-Wert unabhängig beschreiben.

Trotz der Vergrößerung des Retentionsfensters bei geringerem pH-Wert ist der Quotient t_{MC}/t_0 bei Verwendung von SDS unter Standardbedingungen (100 mmol/L SDS, pH 9,0) mit 4,4 [27] deutlich größer. Der Hauptnachteil kationischer Tenside gegenüber anionischen Tensiden und damit limitierend für deren Einsatz in der MEKC ist das schmalere Retentionsfenster, wodurch die Anzahl der pro chromatographischen Lauf trennbaren Analyte und damit die Peakkapazität geringer ist (Gl.12). Eine Verbesserung des Retentionsfensters und damit des Quotienten t_{MC}/t_0 ist notwendig, um die Einsatzmöglichkeit kationischer Tenside in der MEKC zu verbessern.

4 Variation der Zusammensetzung des Trennelektrolyten

Tab.4: Elektroosmotische Mobilität μ_{eo} , elektrophoretische Mobilität der Mizellen μ_{MC} und der Quotient t_{MC}/t_0 für kationische Tenside bei verschiedenen Konzentrationen und pH-Werten (Meßbedingungen: Trennelektrolyt: $c(TTAB) = \text{variabel}$; $c(H_3BO_3) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(Na_2B_4O_7) = 10 \text{ mmol/L}$, $pH = 9,0$; $c(NH_2C(CH_2OH)_3) = 16 \text{ mmol/L}$, $c(HCl) = 16 \text{ mmol/L}$, $pH 7,0$; $c(CH_3COOH) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(CH_3COONa) = 10 \text{ mmol/L}$, $pH = 4,6$; Kapillare: $75 \mu\text{m}$ I.D., 50 cm effektive Länge, 57 cm Gesamtlänge; Analysenspannung 25 kV ; Temperatur 25°C ; Probenaufgabe: Druckinjektion 2s)

Tensid	$c_{\text{Tensid}} / (\text{mmol/L})$	pH-Wert	$\mu_{eo} / (10^{-3} \text{ cm}^2/\text{Vs})$	$\mu_{MC} / (10^{-3} \text{ cm}^2/\text{Vs})$	t_{MC}/t_0
DoTAB	100	9,0	-0,56	0,34	2,5
	70		-0,58	0,34	2,4
	40		-0,62	0,36	2,3
DoTAB	100	7,0	-0,52	0,32	2,5
	70		-0,55	0,33	2,4
	40		-0,59	0,34	2,3
TTAB	100	9,0	-0,56	0,34	2,5
	70		-0,61	0,35	2,3
	40		-0,64	0,37	2,3
TTAB	100	7,0	-0,57	0,32	2,3
	70		-0,60	0,33	2,3
	40		-0,65	0,36	2,2
TTAB	100	4,6	-0,49	0,33	3,0
	70		-0,51	0,34	3,1
	40		-0,54	0,36	3,0
CTAB	100	9,0	-0,61	0,34	2,2
	70		-0,64	0,35	2,2
	40		-0,70	0,37	2,1
CTAB	100	7,0	-0,59	0,31	2,1
	70		-0,62	0,32	2,1
	40		-0,66	0,34	2,1
CTAB	100	4,6	-0,57	0,33	2,4
	70		-0,60	0,34	2,3
	40		-0,64	0,37	2,3

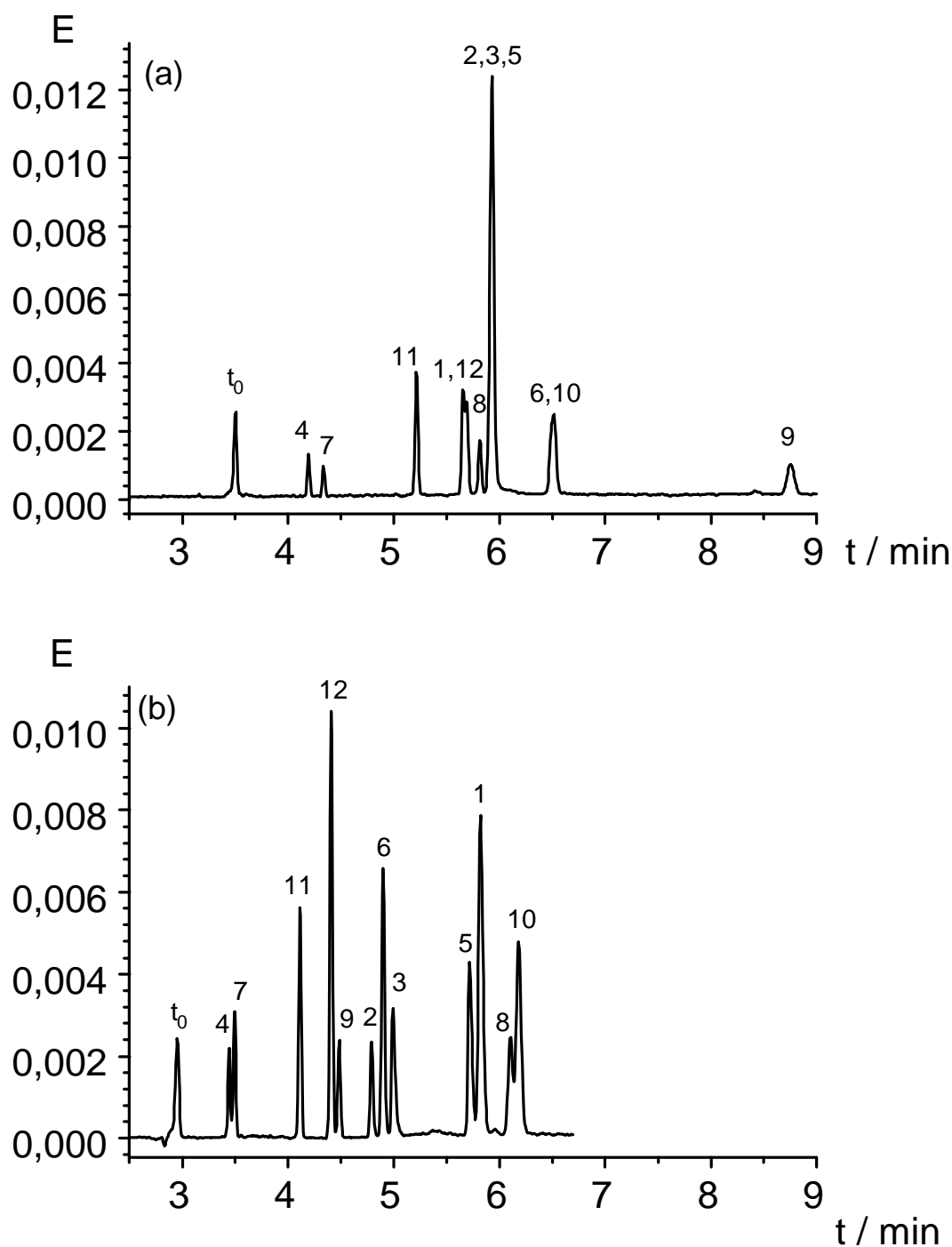


Abb.14: Trennung von aciden und neutralen Analyten in Abhängigkeit vom pH-Wert ((a) 4,6; (b) 9,0)

Peakzuordnung: 1 = Vanillin, 2 = Vanillinsäure, 3 = 3,4-Dihydroxybenzoesäure, 4 = 4-Hydroxy-3-methoxybenzylalkohol, 5 = 4-Hydroxybenzaldehyd, 6 = 4-Hydroxybenzoesäure, 7 = 4-Hydroxybenzylalkohol, 8 = 4-Methoxybenzoesäure, 9 = 4-Methoxybenzaldehyd, 10 = Ethylvanillin, 11 = Piperonal, 12 = Cumarin

(Meßbedingungen: Trennelektrolyt: $c(\text{TTAB}) = 40 \text{ mmol/L}$; (a) $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(\text{CH}_3\text{COONa}) = 10 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 4,6$; (b) $c(\text{H}_3\text{BO}_3) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7) = 10 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 9,0$; Kapillare: $75 \text{ } \mu\text{m}$ I.D., 50 cm effektive Länge, 57 cm Gesamtlänge; Analysenspannung 25 kV ; Temperatur 25°C ; Probenaufgabe: Druckinjektion 2 s)

4.4 Variation der Tensidkonzentration

Mit steigender Tensidkonzentration ist für alle getesteten kationischen Tenside eine lineare Zunahme der Durchflußzeit t_0 und der Migrationszeit der Mizellen t_{MC} , sowie des resultierenden Retentionsfensters (Abb.15) zu beobachten.

Die Aufweitung des Retentionsfensters resultiert aus der mit zunehmender Tensidkonzentration abnehmenden elektroosmotischen Mobilität μ_{eo} , während gleichzeitig die effektive elektrophoretische Mobilität der Mizellen μ_{MC} in geringerem Maße reduziert wird.

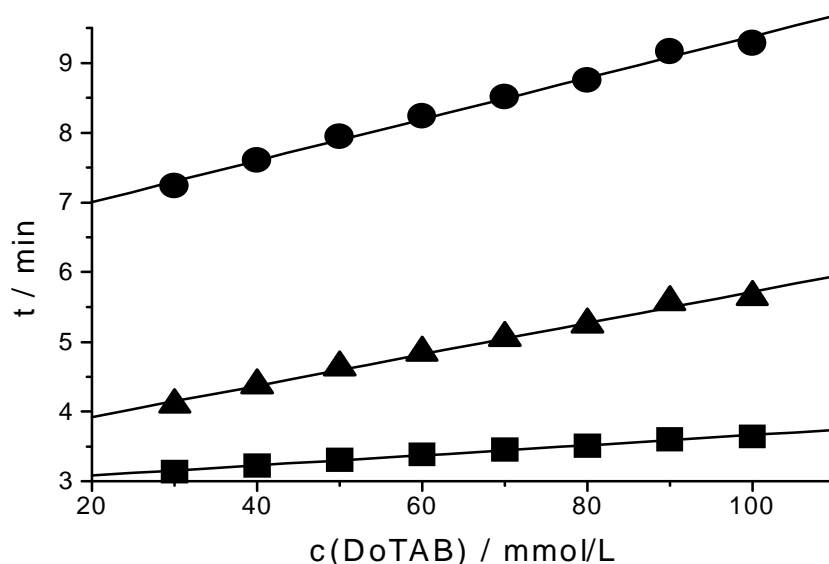


Abb.15: Veränderung der Durchflußzeit t_0 (■), der Migrationszeit der Mizellen t_{MC} (●) und des resultierenden Retentionsfensters (▲) in Abhängigkeit von der Tensidkonzentration (Meßbedingungen: siehe Abb.14; Elektrolyt: $c(\text{DoTAB}) = \text{variabel}$; $c(\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3) = 16 \text{ mmol/L}$, $c(\text{HCl}) = 16 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 7,0$)

Als Trennmechanismen können in der MEKC sowohl die Elektrophorese als auch die Verteilung zwischen der pseudostationären mizellaren und der mobilen wäßrigen Phase genannt werden. Durch die Auftragung des Pseudo-Retentionsfaktors k^* gegen die Tensidkonzentration kann ermittelt werden, welcher Trennmechanismus im gegebenen Fall dominiert. Ist der vorherrschende Trennmechanismus Elektrophorese, so sind die Werte für k^* über den gesamten Konzentrationsbereich nahezu konstant.

Beim Trennmechanismus Verteilung wird dagegen, aufgrund der Volumenzunahme an pseudostationärer Phase, eine lineare Zunahme der Werte für k^* mit der Tensidkonzentration beobachtet.

Bei pH 9,0 wird für ungeladene Analyte eine lineare Abhängigkeit des Pseudo-Retentionsfaktors k^* von der Konzentration des Tensids beobachtet. Bei den dissoziiert vorliegenden Benzoesäuren (3,4-Dihydroxybenzoesäure, Vanillinsäure und 4-Hydroxybenzoesäure) bleibt k^* über den untersuchten Konzentrationsbereich jedoch annähernd konstant (Abb.16a). Bei pH 4,6 wird für alle Analyte eine Erhöhung des Pseudo-Retentionsfaktor mit zunehmender Tensidkonzentration erhalten (Abb.16b), so daß bei diesem pH-Wert Verteilung als der dominierende Trennmechanismus anzunehmen ist. Der Wechsel des Trennmechanismus in Abhängigkeit vom pH-Wert, der für die Benzoesäuren beobachtet wird, beruht darauf, daß diese bei einem pH-Wert von 4,6 weitgehend undissoziiert vorliegen. Für ungeladene Analyte ist somit die Verteilung zwischen mizellarer und wäßriger Phase der vorherrschende Trennmechanismus, bei den negativ geladenen Analyten ist dagegen die Elektrophorese dominierend. Obwohl für die negativ geladenen deprotonierten Analyten die Elektrophorese der dominierende Trennmechanismus ist, kann die postulierte Wechselwirkung (WW) mit den positiv geladenen Mizellen bzw. Tensid-Monomeren nicht ausgeschlossen werden. Da die Detektion am anodischen Ende erfolgt, müßten beim Ausbleiben jeglicher WW die negativ geladenen deprotonierten Analyte, aufgrund der vektoriellen Addition der effektiven elektrophoretischen Mobilität dieser Analyte mit der elektroosmotischen Mobilität, vor dem Durchflußzeitmarker Thioharnstoff eluieren. Eine genauere Untersuchung der vorhandenen WW beim Einsatz kationischer Tenside als mizellenbildender Pufferbestandteil erfolgt in Kap. 4.6.

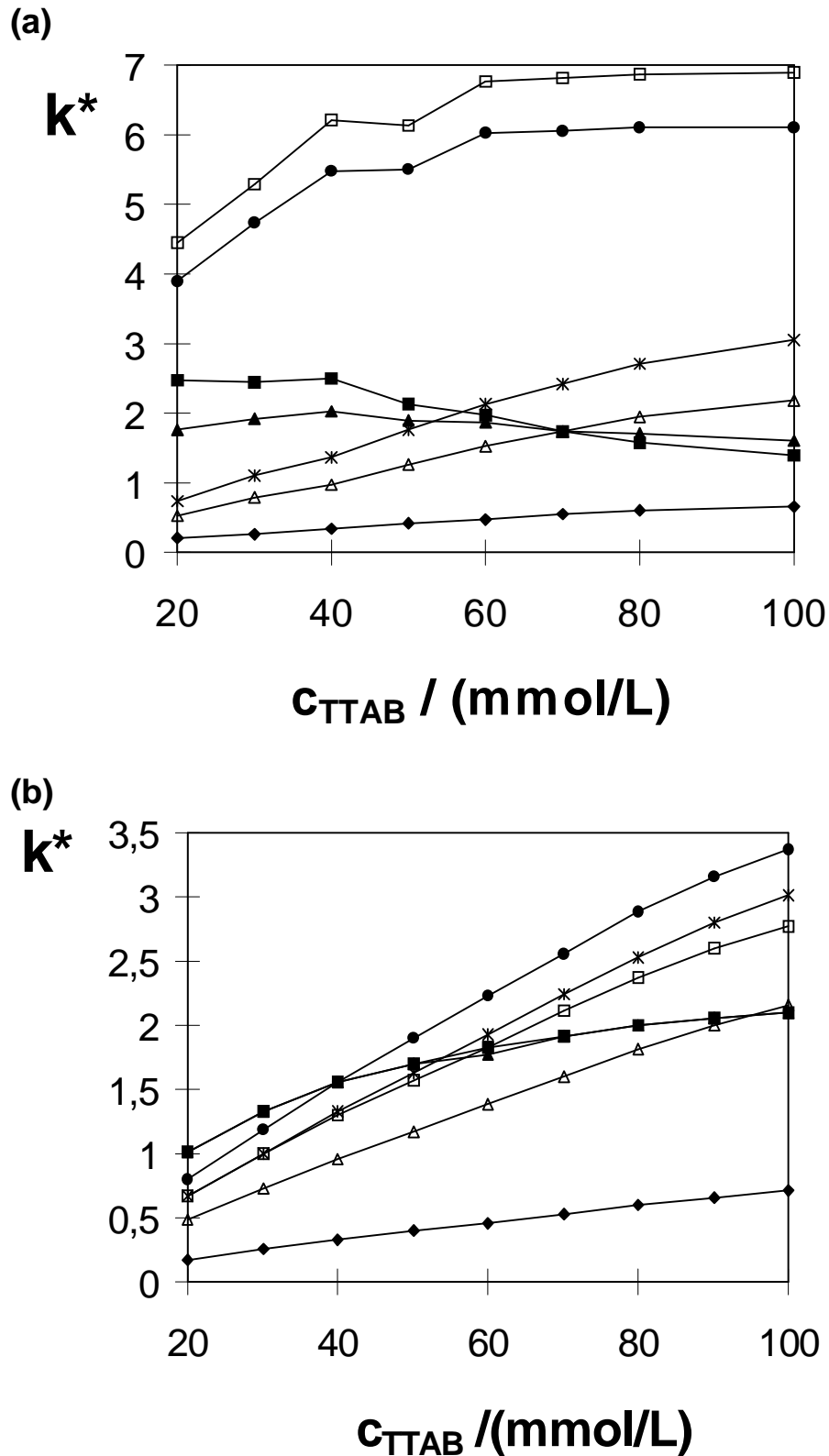


Abb.16: Veränderung der Pseudo-Retentionsfaktoren

Zuordnung: ◆ 4-Hydroxy-3-methoxybenzylalkohol, Δ Piperonal, \square Vanillin, * Cumarin, ● 4-Hydroxybenzaldehyd, ■ 3,4-Dihydroxybenzoesäure, \blacktriangle Vanillinsäure

(Meßbedingungen: Elektrolyt: siehe Abb.14; $c(TTAB)$ = variabel; (a) $c(\text{H}_3\text{BO}_3)$ = 10 mmol/L, $c(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7)$ = 10 mmol/L, pH = 9,0; (b) $c(\text{CH}_3\text{COOH})$ = 10 mmol/L, $c(\text{CH}_3\text{COONa})$ = 10 mmol/L, pH = 4,6)

4.5 Variation der Alkylkettenlänge

Die molekulare Struktur des verwendeten Tensids bestimmt die Anzahl der Tensid-Monomere, die Aggregationszahl, aus denen eine Mizelle aufgebaut ist. Je geringer die Aggregationszahl und je kleiner damit die Mizelle, desto höher wird deren elektrophoretische Mobilität und damit das resultierende Retentionsfenster. Aufgrund der unterschiedlichen Längen des Alkylrestes der untersuchten kationischen Tenside ist mit einer Zunahme der elektrophoretischen Mobilität der Mizellen μ_{MC} mit abnehmender Länge des Alkylrestes zu rechnen. CROSBY UND EL RASSI [12] berichten von einer Zunahme des Retentionsfensters mit abnehmender Länge des Alkylrestes bei ihrer Untersuchung von homologen Reihen kationischer Tenside und erklären dies mit einer Zunahme von μ_{MC} .

Tab.4 (Kap.4.3) zeigt die von uns erhaltenen Werte für die elektroosmotische Mobilität μ_{eo} , die elektrophoretische Mobilität der Mizellen μ_{MC} und den Quotienten t_{MC}/t_0 in Abhängigkeit von der Tensidkonzentration und vom pH-Wert. Wie erwartet, wird mit abnehmender Kettenlänge eine Aufweitung des Retentionsfensters und damit eine Verbesserung des Quotienten t_{MC}/t_0 beobachtet. So vergrößert sich der Quotient t_{MC}/t_0 von 2,2 bei 100 mmol/L CTAB (pH 9) auf 2,5 bei 100 mmol/L DoTAB (pH 9). Die Aufweitung des Retentionsfensters resultiert jedoch nicht, wie angenommen, aus einer Erhöhung der elektrophoretischen Mobilität der Mizellen μ_{MC} ; denn μ_{MC} wird nicht von der Alkylkettenlänge der Tenside beeinflusst. Für μ_{MC} werden unabhängig von der Länge des Alkylrestes bei gleichem pH-Wert und identischer Tensidkonzentration konstante Werte gemessen. Die Aufweitung des Retentionsfensters beruht daher einzig auf der Abnahme der elektroosmotischen Mobilität μ_{eo} mit abnehmender Alkylkettenlänge (bei konstantem pH-Wert und konstanter Tensidkonzentration).

CROSBY UND EL RASSI [12] berichten, daß die Selektivität einer Trennung von der Alkylkettenlänge praktisch unbeeinflusst ist. Beim Vergleich der Trennung der Vanilleinhaltsstoffe mit DoTAB, TTAB und CTAB konnte diese These bestätigt werden (Abb.17a-c). Deutlich wird in Abb.17a-c, daß sich die Auflösung der Signale mit abnehmender Alkylkettenlänge der als Mizellenbildner eingesetzten kationischen Tensiden verbessert. Aufgrund der in Kap. 3.3 genannten Auswahlkriterien ist aber der Einsatz von TTAB als kationischer Mizellenbildner in der MEKC zu favorisieren.

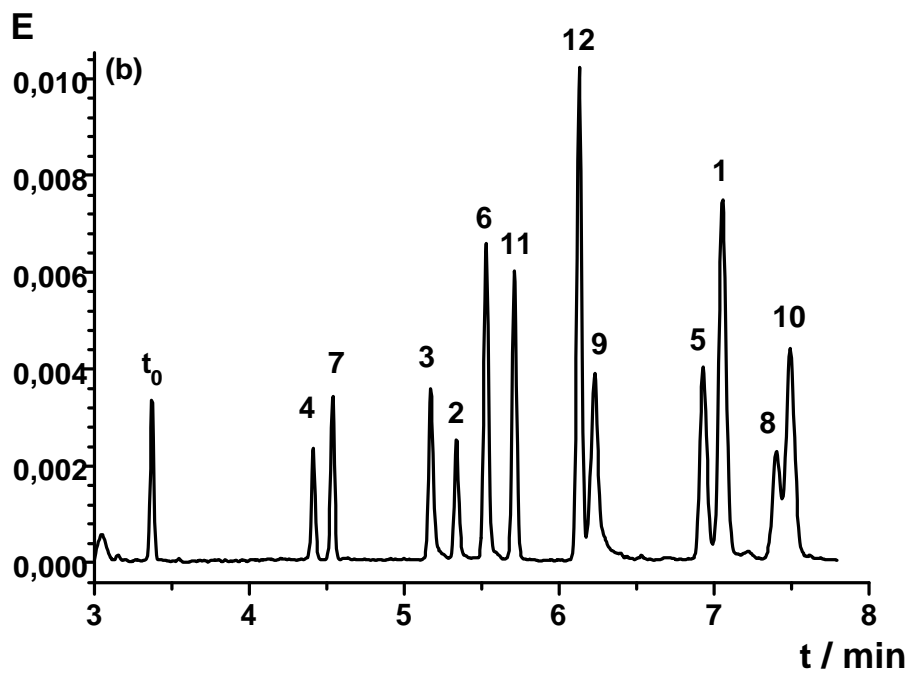
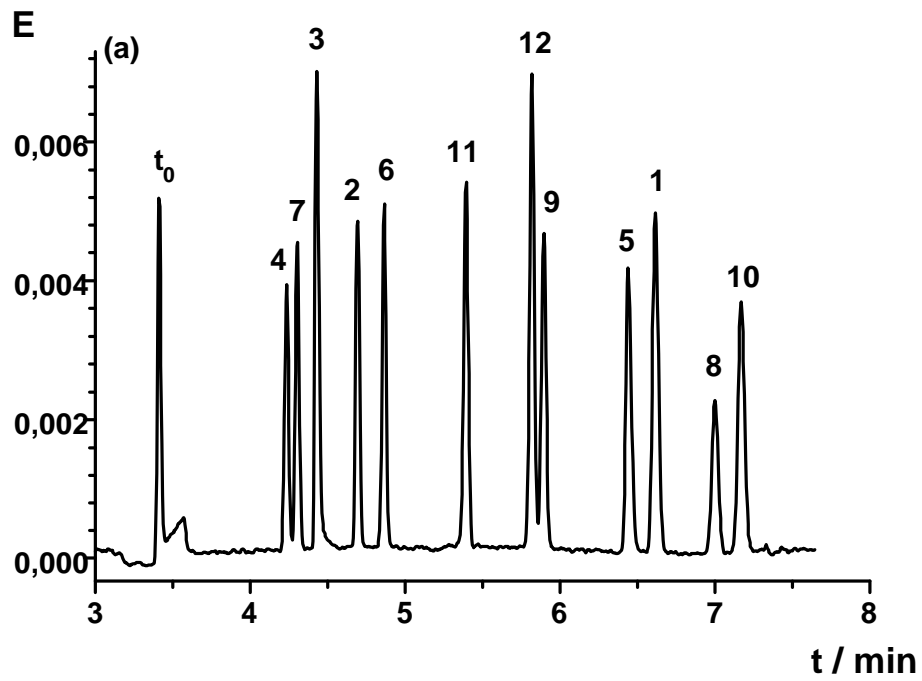


Abb.17: Fortsetzung auf S.40

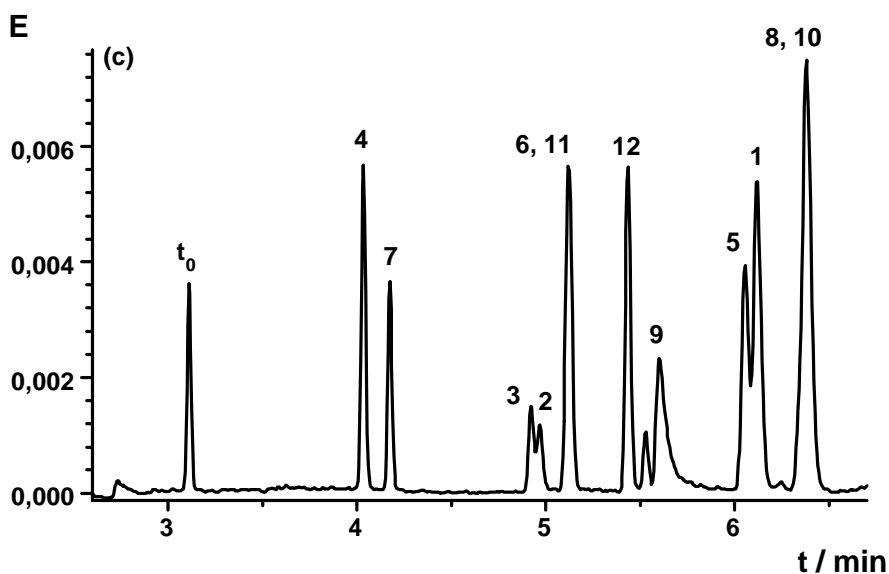


Abb.17: Einfluß der Alkylkettenlänge auf die Trennung acider und neutraler Vanilleinhaltsstoffe ((a) DoTAB, (b) TTAB, (c) CTAB)

Peakzuordnung: siehe Abb.14

(Meßbedingungen: siehe Abb.14; $C_{\text{Tensid}} = 100 \text{ mmol/L}$)

Durch die Änderung der Länge des Alkylrestes und damit der Mizellengröße werden weder die Verteilungskonstanten zwischen wäßriger und mizellarer Phase noch die erwarteten Wechselwirkungen (WW) zwischen den deprotonierten aciden Analyten und den Mizellen bzw. den Tensid-Monomeren beeinflusst.

Mit zunehmender Länge des Alkylrestes des als Mizellenbildner verwendeten kationischen Tensids nimmt die effektive elektrophoretische Mobilität μ_{ep} der Analyte zu. Diese Abhängigkeit ist sowohl bei einem pH-Wert des Trennelektrolyten von 9,0 (Tab.5) als auch bei pH 4,6 (Tab.6) gegeben. Eine mögliche Erklärung könnte die mit zunehmender Länge des Alkylrestes kleinere CMC sein. Die Abnahme der CMC bedeutet, daß trotz gleicher Gesamtstoffmengenkonzentration des Tensids im Trennelektrolyten der Volumenanteil der mizellaren Phase (bezogen auf das Gesamtvolumen des Trennelektrolyten) bei den längerkettigen Alkylammonium-Verbindungen erhöht ist infolge des höheren Stoffmengenanteils aggregierter Tensidmoleküle bezogen auf die Gesamtstoffmenge Tensid. Diese Erklärung würde bedeuten, daß für die Retardierung der anionischen Spezies überwiegend eine Wechselwirkung mit den Mizellen verantwortlich ist, und die postulierte Ionenpaar-Wechselwirkung mit den Tensid-Monomeren eine untergeordnete Rolle spielt. Eine genauere Untersuchung der möglichen WW bei Verwendung kationischer Tenside wird in Kap.4.6 vorgenommen.

Vorteilhaft bei Verwendung kürzerkettiger Alkylammonium-Verbindungen ist, daß aufgrund des etwas größeren Retentionsfensters die Auflösung schlecht getrennter Signale verbessert wird. Da dieser Effekt eher gering ist und die zuvor erwähnten Nachteile überwiegen, ist der Einsatz von TTAB gegenüber DoTAB begünstigt. Mit CTAB ist das Elutionsfenster noch enger, so daß CTAB nicht als Mizellenbildner in der MEKC eingesetzt werden sollte.

Tab.5: Vergleich der elektrophoretische Mobilitäten μ_{ep} der Analyte, die bei Verwendung von DoTAB, TTAB oder CTAB erhalten werden

(Meßbedingungen: siehe Abb.14; Elektrolyt : $c(\text{Tensid}) = 100 \text{ mmol/L}$; $c(\text{H}_3\text{BO}_3) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7) = 10 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 9,0$)

	DoTAB	TTAB	CTAB
Analyt	$\mu_{ep} / (10^{-3} \text{ cm}^2/\text{Vs})$	$\mu_{ep} / (10^{-3} \text{ cm}^2/\text{Vs})$	$\mu_{ep} / (10^{-3} \text{ cm}^2/\text{Vs})$
4-Hydroxy-3-methoxybenzylalkohol	0,108	0,133	0,140
4-Hydroxybenzylalkohol	0,115	0,145	0,155
3,4-Dihydroxybenzoesäure	0,128	0,196	0,224
Vanillinsäure	0,152	0,207	0,228
4-Hydroxybenzoesäure	0,166	0,220	0,239
Piperonal	0,204	0,231	0,239
Cumarin	0,230	0,253	0,261
4-Methoxybenzaldehyd	0,234	0,258	0,267
4-Hydroxybenzaldehyd	0,262	0,289	0,297
Vanillin	0,269	0,294	0,297
4-Methoxybenzoesäure	0,285	0,307	0,313
Ethylvanillin	0,292	0,310	0,313

Tab.6: Vergleich der elektrophoretische Mobilitäten μ_{ep} der Analyte, die bei Verwendung von TTAB oder CTAB erhalten werden

(Meßbedingungen: siehe Abb.14; $c(\text{Tensid}) = 100 \text{ mmol/L}$; $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(\text{CH}_3\text{COONa}) = 10 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 4,6$)

Analyt	TTAB	CTAB
	$\mu_{ep} / (10^{-3} \text{ cm}^2/\text{Vs})$	$\mu_{ep} / (10^{-3} \text{ cm}^2/\text{Vs})$
4-Hydroxy-3-methoxybenzylalkohol	0,137	0,143
4-Hydroxybenzylalkohol	0,155	0,165
3,4-Dihydroxybenzoesäure	0,224	0,234
Vanillinsäure	0,224	0,229
4-Hydroxybenzoesäure	0,248	0,256
Piperonal	0,226	0,236
Cumarin	0,248	0,256
4-Methoxybenzaldehyd	0,253	0,262
4-Hydroxybenzaldehyd	0,255	0,265
Vanillin	0,243	0,252
4-Methoxybenzoesäure	0,302	0,306
Ethylvanillin	0,272	0,279

4.6 Wechselwirkung kationischer Tenside mit den Analyten

4.6.1 Messungen mit kationischen Tensiden unterhalb der CMC

Um aufzuklären, ob Wechselwirkungen zwischen den Tensid-Monomere und den negativ geladenen deprotonierten Analytmolekülen bestehen, wurden elektrophoretische Trennungen bei Tensidkonzentrationen unterhalb der kritischen mizellaren Konzentration (CMC) durchgeführt. Bei dieser Tensidkonzentration findet zwar eine Umkehrung des EOF statt, aber die Bildung von Mizellen unterbleibt. Aufgrund seiner hohen CMC wurden diese Messungen mit DoTAB als kationischem Tensid bei einer Konzentration von 5 mmol/L im Trennelektrolyten und einem pH von 9,0 durchgeführt. Als Test-Analyte wurden die Inhaltsstoffe der Vanille, sowie Ethylvanillin, Cumarin und Piperonal verwendet.

Um eine Aussage zu den bei der elektrophoretischen Trennung mit EOF-Umkehr erhaltenen Daten machen zu können, wurde eine elektrophoretische Trennung ohne EOF-Umkehr unter ansonsten gleichen chromatographischen Bedingungen (Trennspannung, Zusammensetzung des Trennelektrolyten, Temperatur) durchgeführt. Die möglichen Veränderungen in bezug auf die Elutionsreihenfolge und die effektive elektrophoretische Mobilität der Analyte könnten einen Hinweis über das Vorhandensein der in Kap. 3.4 postulierten WW zwischen den negativ geladenen deprotonierten Analyten und den positiv geladenen Tensid-Monomere geben.

Auffällig ist, daß durch Zugabe des kationischen Tensids eine genaue Umkehr der Elutionsreihenfolge beobachtet wird (Abb.18a/b). Die Berechnung der effektiven elektrophoretischen Mobilitäten μ_{ep} der Analyte zeigte, daß sich die Werte aller Analyte nicht voneinander unterscheiden (Tab.7). Die erwartete Bildung von Ionenpaaren zwischen Tensid-Monomeren und deprotonierten Analyten kann damit ausgeschlossen werden.

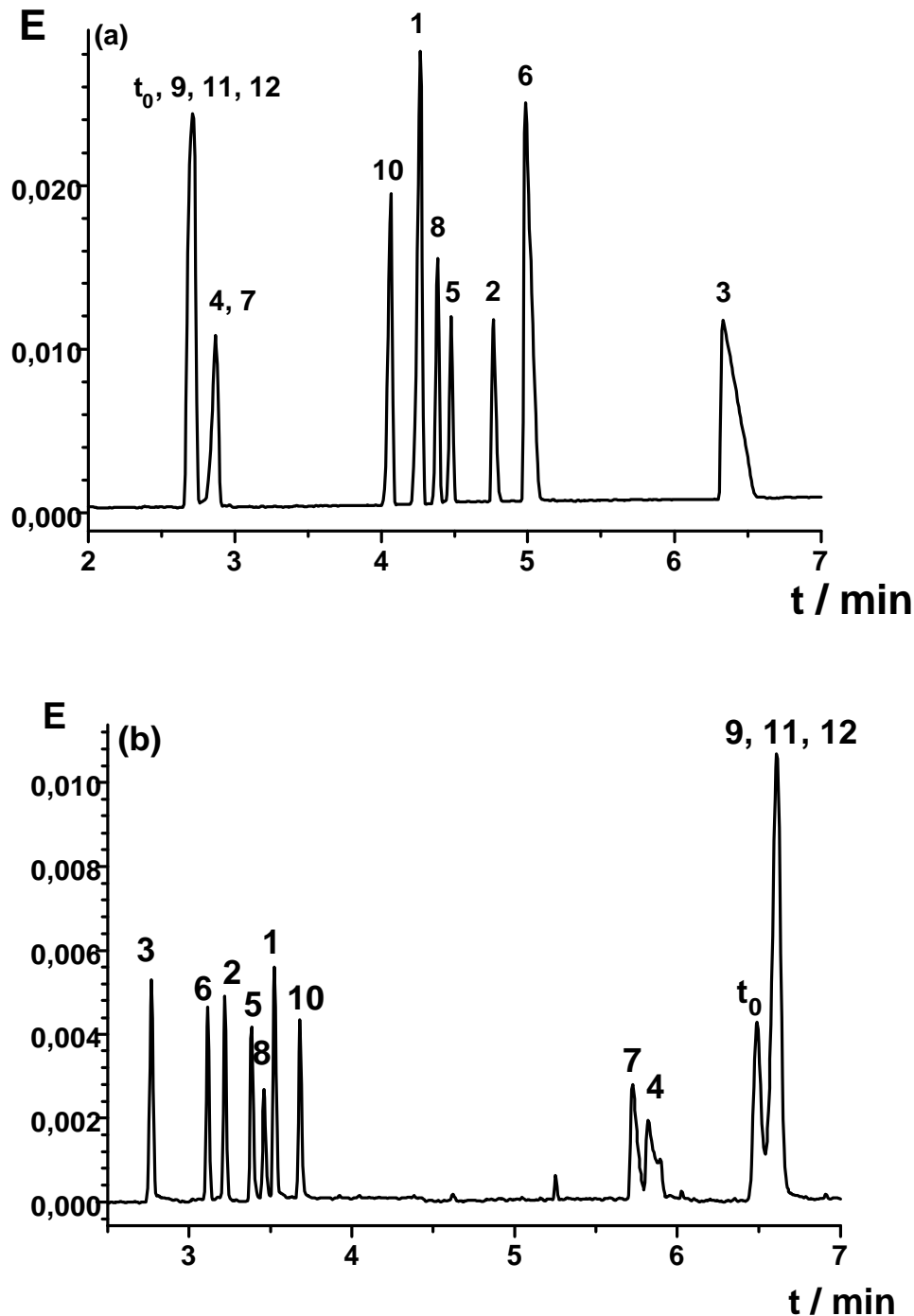


Abb.18: Kapillarelektrophoretische Trennung acider und neutraler Analyte ohne (a) und mit (b) EOF-Umkehr

Peakzuordnung: 1 = Vanillin, 2 = Vanillinsäure, 3 = 3,4-Dihydroxybenzoesäure, 4 = 4-Hydroxy-3-methoxybenzylalkohol, 5 = 4-Hydroxybenzaldehyd, 6 = 4-Hydroxybenzoesäure, 7 = 4-Hydroxybenzylalkohol, 8 = 4-Methoxybenzoesäure, 9 = 4-Methoxybenzaldehyd, 10 = Ethylvanillin, 11 = Piperonal, 12 = Cumarin

(Meßbedingungen: siehe Abb.14; Trennelektrolyt: (a) $c(\text{H}_3\text{BO}_3) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7) = 10 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 9,0$; (b) $c(\text{DoTAB}) = 5 \text{ mmol/L}$; $c(\text{H}_3\text{BO}_3) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7) = 10 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 9,0$)

4.6.2 Messungen oberhalb der CMC

Beim Vergleich zwischen den mit dem anionischen Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS) und den kationischen Tensiden erhaltenen Trennungen zeigen sich charakteristische Unterschiede in der Selektivität. Die Benzoessäuren (Vanillinsäure, 4-Hydroxybenzoessäure und 3,4-Dihydroxybenzoessäure) liegen bei einem pH-Wert von ≤ 7 überwiegend dissoziiert vor. Bei diesem pH-Wert sind keine Wechselwirkungen (WW) mit den negativ geladenen SDS-Mizellen und den negativ geladenen deprotonierten Analyten zu erwarten. Bei einer Messungen mit 100 mmol/L SDS bei pH 9 werden nahezu die gleichen Werte für die elektrophoretischen Mobilitäten μ_{ep} der Benzoessäuren und der polaren Phenole (Vanillin, 4-Hydroxybenzaldehyd und Ethylvanillin) erhalten wie bei der entsprechenden Messung in reinem Puffer (Tab.7). Bei einem pH-Wert von 7 ist die Dissoziation der polaren Phenole ($pK_s \approx 9$) unterdrückt und der beschriebene Effekt nur noch bei den Benzoessäuren zu beobachten (Tab.8).

Bei Verwendung eines Trennelektrolyten, der ein kationisches Tensid in einer Konzentration oberhalb der kritischen mizellaren Konzentration (CMC) enthält, werden die Analyte erst nach dem Durchflusszeitmarker Thioharnstoff eluiert. Die dabei auftretende Änderung der Elutionsreihenfolge ist auf die WW mit den kationischen Mizellen zurückzuführen. Die elektrophoretische Mobilität μ_{ep} der Analyte ist dann durch die WW mit den Mizellen positiv und in Richtung Kathode orientiert (Tab.5). Die Umkehr der Richtung der effektiven elektrophoretischen Mobilität ist bei einem hohen pH-Wert wie 9,0 auch für die dissoziiert vorliegenden Benzoessäuren festzustellen, und es kann damit die Existenz der in Abb.11 postulierten elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen positiv geladenen Mizellen und negativ geladenen Analyten bestätigt werden.

Tab.7: Vergleich der elektrophoretischen Mobilitäten μ_{ep} der Analyte bei einer CE-Messung ohne und einer CE-Messung mit EOF-Umkehr durch Zugabe von 5 mmol/L DoTAB, sowie einer Messung mit 100 mmol/L SDS.

(Meßbedingungen: siehe Abb.14; $c(\text{H}_3\text{BO}_3) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7) = 10 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 9,0$)

	CE	$c_{\text{Tensid}} < \text{CMC}$	SDS
Analyt	$\mu_{ep} / (10^{-3} \text{ cm}^2/\text{Vs})$	$\mu_{ep} / (10^{-3} \text{ cm}^2/\text{Vs})$	$\mu_{ep} / (10^{-3} \text{ cm}^2/\text{Vs})$
Piperonal	0	0,006	-0,300
Cumarin	0	0,006	-0,331
4-Methoxybenzaldehyd	0	0,006	-0,325
4-Hydroxy-3-methoxybenzylalkohol	-0,034	-0,034	-0,162
4-Hydroxybenzylalkohol	-0,036	-0,039	-0,123
Ethylvanillin	-0,228	-0,223	-0,223
Vanillin	-0,253	-0,246	-0,232
4-Methoxybenzoesäure	-0,265	-0,256	-0,239
4-Hydroxybenzaldehyd	-0,271	-0,269	-0,256
Vanillinsäure	-0,293	-0,297	-0,277
4-Hydroxybenzoesäure	-0,311	-0,317	-0,297
3,4-Dihydroxybenzoesäure	-0,394	-0,393	-0,368

Tab.8: Vergleich der elektrophoretischen Mobilitäten μ_{ep} der Analyte bei einer CE-Messung ohne und einer CE-Messung mit EOF-Umkehr durch Zugabe von 5 mmol/L DoTAB, sowie einer Messung mit 100 mmol/L SDS.

(Meßbedingungen: siehe Abb.14; $c(\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3) = 16 \text{ mmol/L}$, $c(\text{HCl}) = 16 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 7,0$)

	CE	$c_{\text{Tensid}} < \text{CMC}$	SDS
Analyt	$\mu_{ep} / (10^{-3} \text{ cm}^2/\text{Vs})$	$\mu_{ep} / (10^{-3} \text{ cm}^2/\text{Vs})$	$\mu_{ep} / (10^{-3} \text{ cm}^2/\text{Vs})$
Piperonal	0	0	-0,311
Cumarin	0	0	-0,343
4-Methoxybenzaldehyd	0	0	-0,337
4-Hydroxy-3-methoxybenzylalkohol	0	0	-0,162
4-Hydroxybenzylalkohol	0	0	-0,114
Ethylvanillin	-0,061	-0,058	-0,304
Vanillin	-0,078	-0,073	-0,260
4-Methoxybenzoesäure	-0,271	-0,253	-0,248
4-Hydroxybenzaldehyd	-0,061	-0,058	-0,234
Vanillinsäure	-0,248	-0,222	-0,222
4-Hydroxybenzoesäure	-0,273	-0,260	-0,245
3,4-Dihydroxybenzoesäure	-0,255	-0,244	-0,231

5 Analyse von Vanille-Zubereitungen

Ein Vorteil der MEKC gegenüber der Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) ist, daß die pseudostationäre Phase vor jedem neuen chromatographischen Lauf durch Spülprozesse erneuert wird. Irreversible Sorption von Bestandteilen der Probe an der stationären Phase, welche in der HPLC unbedingt vermieden werden muß, ist in der MEKC völlig unproblematisch. Somit sind aufwendige Probenvorbereitungsschritte bei der Analyse von Realproben mit der MEKC nicht notwendig, meist genügt eine Verdünnung der Probe mit Wasser.

5.1 Zusammensetzung handelsüblicher Vanille-Präparate

Im Handel erhältliche Vanille-Präparate sind zu einem großen Teil durch ethanolische Extraktion von Vanilleschoten gewonnen worden. In der Literatur [28-30] ist der Einfluß hoher Volumenanteile organischer Lösungsmittel in der Probenlösung auf die mit der MEKC erreichbare Trennleistung und die resultierenden Retentionszeiten beschrieben worden. ACKERMANS et al. [29] untersuchten am Beispiel der Trennung einiger schlecht wasserlöslicher Arzneimittel den Einfluß von Methanol in der Probenlösung auf die Trennleistung der MEKC. Sie beobachteten mit zunehmendem Methanolanteil in der Probenlösung eine drastisch verschlechterte Effizienz der Trennung und abnehmende Retentionszeiten der Analyte, bei gleichbleibendem EOF. Sie erklärten diese Phänomene mit einer Verschiebung der Gleichgewichtskonstanten zwischen mizellarer und wäßriger Phase, in Richtung der wäßrigen Phase, sowie einem lokal beschränktem Zusammenbruch der Mizellenstruktur. CRABTREE et al. [30] untersuchten den Einfluß von Acetonitril in der Probenlösung bei der Trennung von 2,4-Dinitrophenylhydrazonen. Neben den Beobachtungen von ACKERMANS et al. [29] beobachteten sie bei einem hohen Anteil von Acetonitril (>50%) in der Probenlösung Peakaufspaltung.

Die von ihnen vorgebrachten Argumente zum Einfluß eines hohen organischen Anteils in der Probenlösung auf Migrationszeit und Peakform decken sich mit denen von ACKERMANS et al. [29]. Die Untersuchungen wurden in beiden Fällen mit Natriumdodecylsulfat (SDS) als Mizellenbildner durchgeführt.

Um den Einfluß des Volumenanteils Ethanol in der Probenlösung auf die mit kationischem Tensid erzielbare Trennung zu erfassen, wurden folgende Messreihen durchgeführt. Wäßrige oder gepufferte Proben mit unterschiedlichem Volumenanteil Ethanol wurden vorbereitet. Der Volumenanteil Ethanol wurde von 0 auf 60 % (v/v) bei gleichbleibender Analytkonzentration erhöht. Die Probe enthielt 4-Hydroxy-3-methoxybenzylalkohol, Piperonal, Cumarin, Vanillinsäure, 3,4-Dihydroxybenzoesäure, 4-Hydroxybenzaldehyd und Vanillin in einer Konzentration von 50 bis 250 mg/L. Als Trennelektrolyt wurde 100 mmol/L TTAB mit 10 mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ und 10 mmol/L H_3BO_3 (pH 9) verwendet. Die erhaltenen Chromatogramme wurden hinsichtlich der Retentionszeiten und der Bodenzahlen ausgewertet.

Die Erhöhung des Volumenanteils Ethanol in der Probenlösung hat erst bei einem hohen Volumenanteil von 60 % (v/v) einen signifikanten Einfluß auf die Retentionszeiten der Analyte. Interessanterweise führt die Erhöhung des Volumenanteils von Ethanol in der rein wäßrigen Probe zu einer Abnahme der Retentionszeit, während bei Messungen der gepufferten Probe eine Zunahme beobachtet wird (Tab.9). Eine Erklärung für diesen gegenläufigen Effekt kann zu diesem Zeitpunkt nicht gegeben werden. Die Bodenzahlen nehmen dagegen in beiden Fällen schon bei einem geringen Volumenanteil Ethanol drastisch ab (Tab.10).

5 Analyse von Vanille Zubereitungen

Tab.9: Retentionszeiten (min) in Abhängigkeit vom Volumenanteil Ethanol in der Probenlösung bei rein wäßriger bzw. gepufferten Probe

(Meßbedingungen: siehe Abb.14; $c(\text{TTAB}) = 100 \text{ mmol/L}$, $c(\text{H}_3\text{BO}_3) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7) = 10 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 9,0$)

Analyte	rein wäßrig				gepuffert			
	0	20	40	60	0	20	40	60
4-Hydroxy-3-methoxybenzylalkohol	4,013	4,016	3,999	3,977	4,051	4,049	4,186	4,187
3,4-Dihydroxybenzoesäure	4,653	4,652	4,633	4,597	4,707	4,715	4,923	4,933
Vanillinsäure	4,771	4,771	4,744	4,694	4,825	4,830	5,038	5,039
Piperonal	5,034	5,038	5,004	4,927	5,096	5,093	5,311	5,308
Cumarin	5,354	5,359	5,319	4,947	5,420	5,420	5,665	5,664
4-Hydroxybenzaldehyd	5,966	5,973	5,914	5,254	6,045	6,054	6,360	6,356
Vanillin	6,057	6,065	6,002	5,801	6,138	6,147	6,459	6,447

Tab.10: Trennstufenzahlen $N \times 10^3$ in Abhängigkeit vom Volumenanteil Ethanol in der Probenlösung bei rein wäßriger bzw. gepufferten Probe

(Meßbedingungen: siehe Tab.9)

Analyte	rein wäßrig				gepuffert			
	0	20	40	60	0	20	40	60
4-Hydroxy-3-methoxybenzylalkohol	152	79	36	11	183	87	43	25
3,4-Dihydroxybenzoesäure	131	155	98	21	145	140	81	36
Vanillinsäure	226	251	109	35	237	215	86	42
Piperonal	230	176	73	83	261	187	85	43
Cumarin	257	188	86	92	274	206	90	45
4-Hydroxybenzaldehyd	265	257	73	31	270	236	62	16
Vanillin	245	235	91	44	266	234	70	16

5.2 Analyse eines käuflichen Vanille-Extrakts

Ein in den U.S.A. käuflich erworbener Vanille-Extrakt, der nach Hersteller-Angaben durch ethanolische Extraktion einer Vanilleschote erhalten wurde, wurde auf seine Authentizität untersucht. Der bräunliche, sirupartige Extrakt wurde im Verhältnis 1:4 mit bidestilliertem Wasser verdünnt und zur Entfernung von Schwebeteilchen durch einen Membranfilter filtriert. Die Trennung der interessierenden Probenbestandteile wurde mittels MEKC bei pH 9,0 mit einer Tensidkonzentration von $c_{TTAB} = 100 \text{ mmol/L}$ durchgeführt. In dem erhaltenen Chromatogramm (Abb.20a) konnten durch "Peak-Spiking" sechs Signale identifiziert werden. Obwohl Vanillin als Hauptbestandteil in sehr großer Konzentration vorliegt, wird kein Peak tailing beobachtet und das in der Flanke befindliche Signal des 4-Hydroxybenzaldehyds läßt sich gut als solches erkennen und identifizieren. Zusätzlich können Vanillinsäure, 3,4-Dihydroxybenzoesäure, 4-Hydroxy-3-methoxybenzylalkohol und 4-Hydroxybenzylalkohol identifiziert werden. Die Zahl der identifizierten Signale (alle charakteristische Bestandteile authentischer Extrakte (Abb.20b)) weist daraufhin, daß es sich bei dem Vanille-Extrakt um ein Produkt natürlichen Ursprungs handelt. Das extreme Konzentrationsverhältnis von Vanillin zu weiteren identifizierten Bestandteilen gibt jedoch einen Hinweis darauf, daß der Extrakt möglicherweise mit synthetischem Vanillin angereichert wurde. Zur Klärung dieser Frage müßte das Isotopenverhältnis ermittelt werden, da natürliches Vanillin mit Deuterium und Kohlenstoff 13 angereichert ist.

Zum Vergleich der erhaltenen Daten wurden die Aromastoffe einer Vanille-Schote mittels Soxhlet-Extraktion mit Ethanol ($\varphi = 35\%$) extrahiert. Der erhaltene Extrakt wurde unter den gleichen Bedingungen chromatographisch (Abb.20b) analysiert. Im Chromatogramm des Extraktes konnten mit Ausnahme der beiden Benzylalkohole alle Analytezuordnungen bestätigt werden. Im Extrakt sind die absolut Konzentrationen geringer als im käuflich erworbenen, aber das Verhältnis der Signalhöhen untereinander ist vergleichbar.

Der Vorteil des großen pH-Bereichs bei Verwendung kationischer Tenside als Mizellenbildender Pufferbestandteil wird bei der Analyse des kommerziell erhältlichen Extrakts deutlich.

Während bei pH 9,0 für die Signale des Vanillins (1) und des 4-Hydroxybenzaldehyds (5) keine Basislinientrennung realisiert wurde, gelingt diese bei pH 4,6 (Abb.19). Im Chromatogramm bei pH 4,6 ist ein anderes Peakflächenverhältnis als bei der Trennung bei pH 9,0 zu erkennen. Diese Veränderung des Peakflächenverhältnisses ist auf durch Alterung der Probe (z. B. durch die Oxidation von Vanillin zu Vanillinsäure) zu erklären.

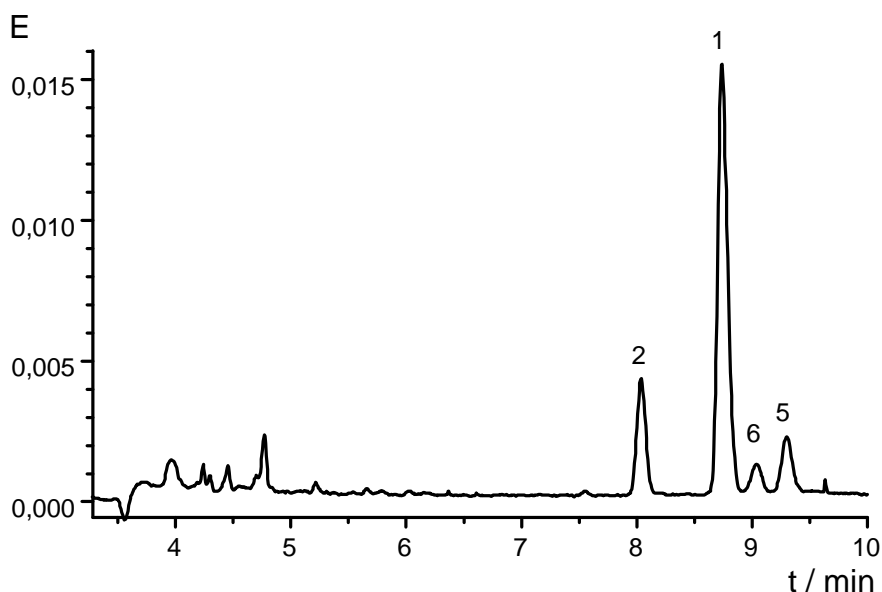


Abb.19: Chromatogramm eines käuflichen Vanille-Extrakts erhalten mit einem bei pH 4,6 gepufferten Trennelektrolyten

Zuordnung: 1 = Vanillin, 2 = Vanillinsäure, 4 = 4-Hydroxy-3-methoxybenzylalkohol, 5 = 4-Hydroxybenzaldehyd, 6 = 4-Hydroxybenzoesäure, 7 = 4-Hydroxybenzylalkohol)

(Meßbedingungen: siehe Abb.14; Trennelektrolyt: $c(\text{TTAB}) = 100 \text{ mmol/L}$; $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(\text{CH}_3\text{COONa}) = 10 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 4,6$)

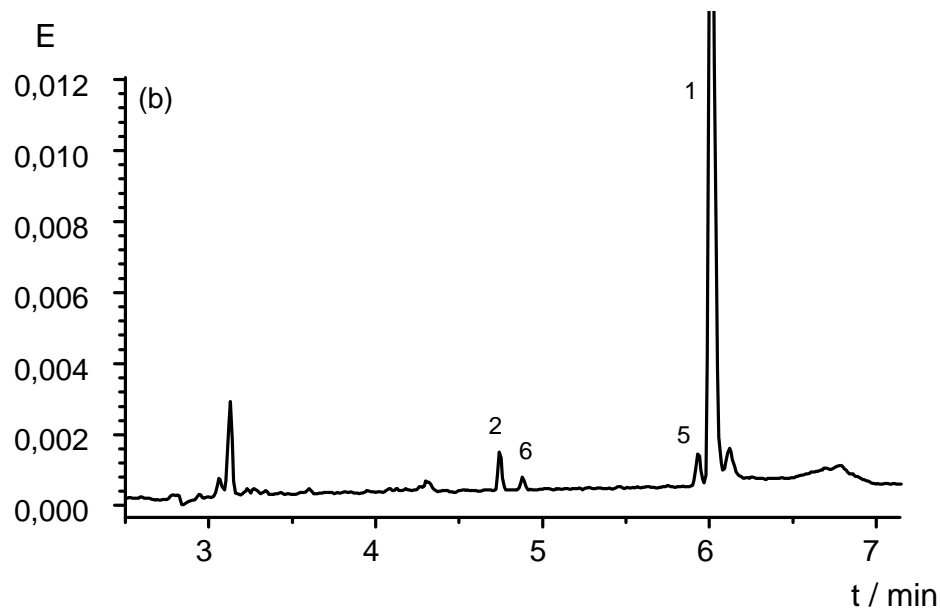
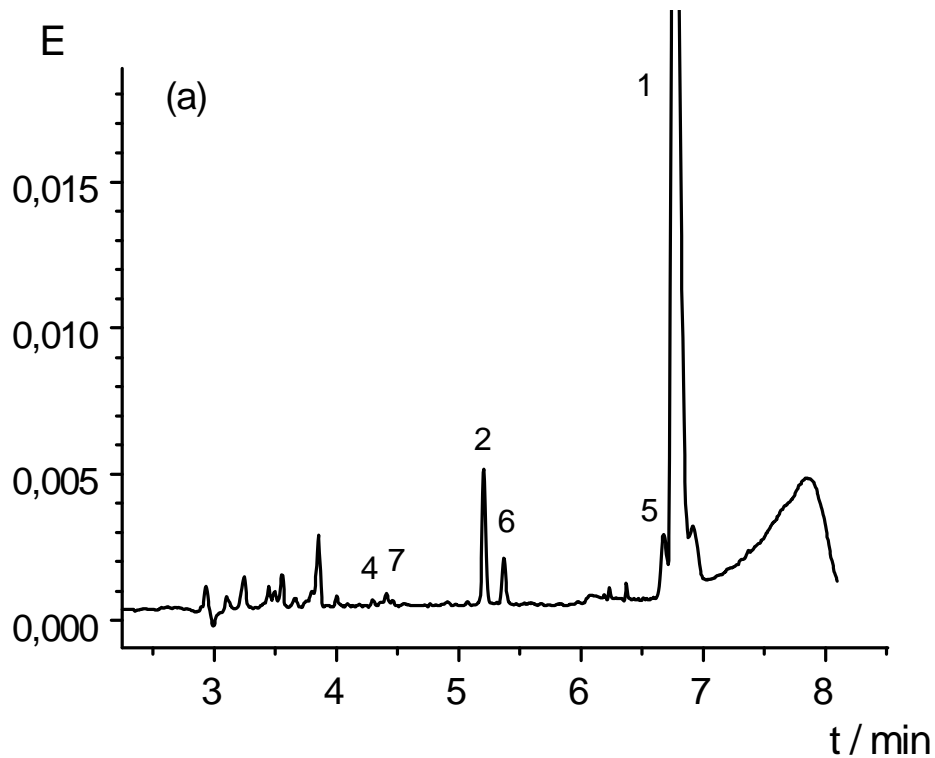


Abb.20: Vergleich des Chromatogramms eines käuflichen Vanille-Extrakts (a) mit einem im Labor hergestellten ethanolischen Extrakt einer Vanille-Schote (b), erhalten mit einem bei pH 9,0 gepufferten Trennelektrolyten

(Zuordnung: s. Abb.19)

(Meßbedingungen: siehe Abb.14; Trennelektrolyt: $c(\text{TTAB}) = 100 \text{ mmol/L}$; $c(\text{H}_3\text{BO}_3) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7) = 10 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 9,0$)

5.3 Weitere analysierte Realproben

Als weitere Realproben wurden Proben von Vanillin-Zucker, einem Vanille-Duftöl, einem Vanille-Parfüm und von Butter-Vanille, sowie eines Vanille-Tees und eines Vanille-Kaffees wie folgt vorbereitet und analysiert. Die Proben des Duftöls und des Parfüms wurden durch Verdünnung um den Faktor 100 bzw. 10 mit bidestilliertem Wasser und anschließender Filtration durch einen Membranfilter vorbereitet. Die Inhaltsstoffe des Vanillin-Zuckers wurden durch fünfminütiges Aufkochen des Inhalts eines handelsüblichen Beutels in 30 mL bidestilliertem Wasser gelöst. Die zu vermessende Probe wurde durch Verdünnung um den Faktor 10 erhalten. Zur Vorbereitung der Probe der Butter-Vanille wurde der Inhalt eines handelsüblichen Fläschchens in 20 mL bidestilliertem Wasser fünf Minuten gekocht und die wäßrige Phase direkt vermessen.

Ein mit Vanille aromatisierter Tee und ein löslicher Kaffee mit Vanillearoma wurden zu 0,5 g 5 min in bidestilliertem Wasser gekocht und die überstehende Lösung nach dem Verdünnen im Verhältnis 1:4 mit bidestilliertem Wasser mittels MEKC analysiert. Die Trennbedingungen entsprechen denen aus Kap.8.2.

In den erhaltenen Chromatogrammen (Abb.21-26) wird deutlich, daß es sich bei den Proben überwiegend um synthetisch erzeugtes Vanille-Aroma handelt. Die Identifizierung der erhaltenen Signale erfolgte durch „Peak-Spiking“. Im Chromatogramm (Abb.21) der Probe des Vanillin-Zuckers wird erwartungsgemäß nur ein Signal, das des Vanillins, erhalten. In den übrigen Proben konnte als Hauptbestandteil Vanillin identifiziert werden. Im Duft-Öl (Abb.22) konnte zusätzlich Cumarin und in der Probe des Parfüms (Abb.23) das Ethylvanillin identifiziert werden. Das für Butter-Vanille erhaltene Chromatogramm (Abb.24) enthält neben dem Signal für Vanillin noch ein kleines Signal, das dem Cumarin zugeordnet werden konnte. Die Probe des Kaffees lieferte im Chromatogramm (Abb.25) nur zwei Signale, wobei eines dem Vanillin und das größere dem Koffein zugeordnet werden konnte. Eine Aussage über die Herkunft des Vanillins ist nicht möglich. Aus dem Chromatogramm (Abb.26) des Vanille-Tees läßt sich aufgrund der identifizierten Signale (Vanillin, Vanillinsäure und 4-Hydroxybenzoesäure) vermuten, daß die Aromatisierung mit natürlicher Vanille erfolgte. Bei einer optischen Prüfung des Tees ließen sich Stücke einer Vanilleschote nachweisen.

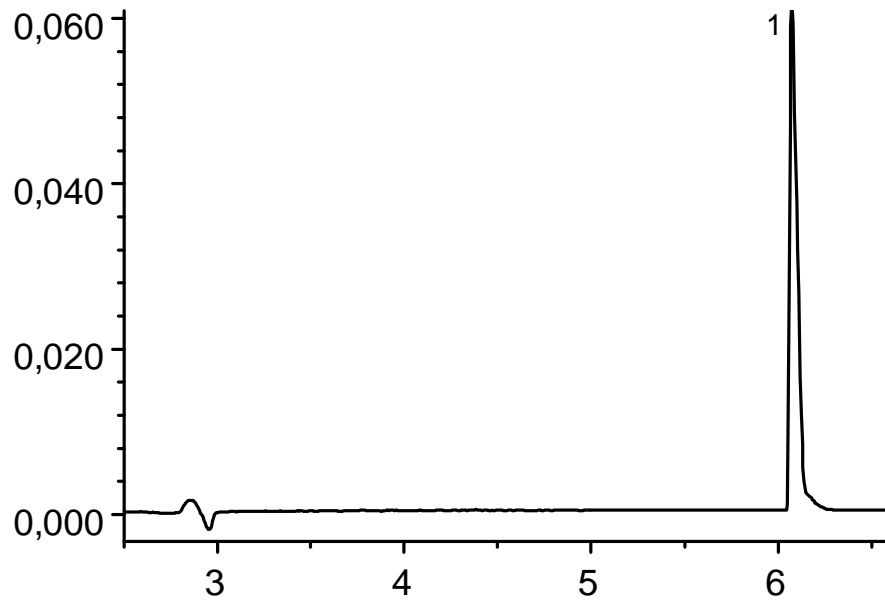


Abb.21: Chromatogramm der wäßrigen Lösung eines Vanillin-Zuckers

Zuordnung: 1 = Vanillin

(Meßbedingungen: siehe Abb.14)

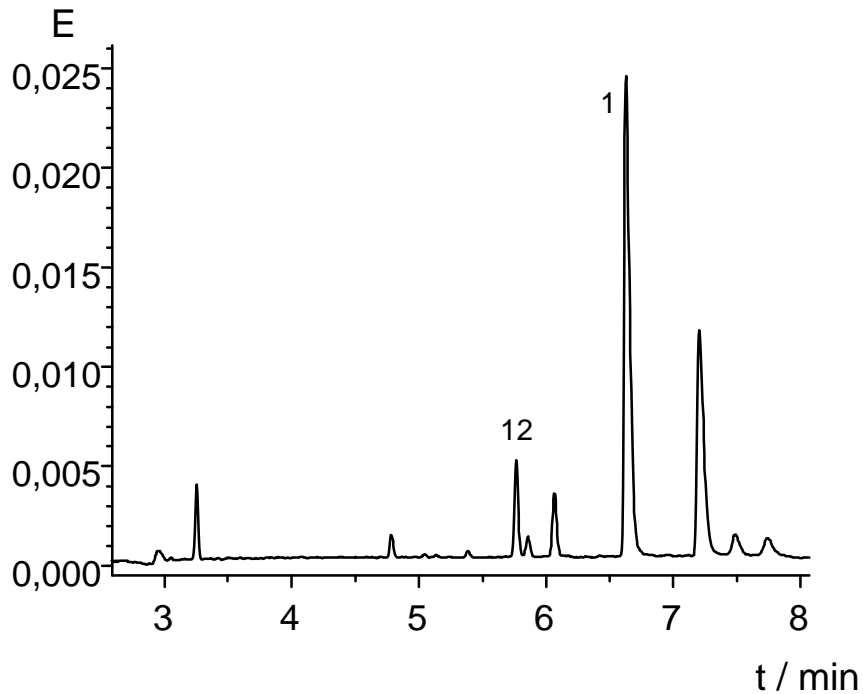


Abb.22: Chromatogramm eines mit Wasser verdünnten Duft-Öls

Zuordnung: 1 = Vanillin, 12 = Cumarin

(Meßbedingungen: siehe Abb.14)

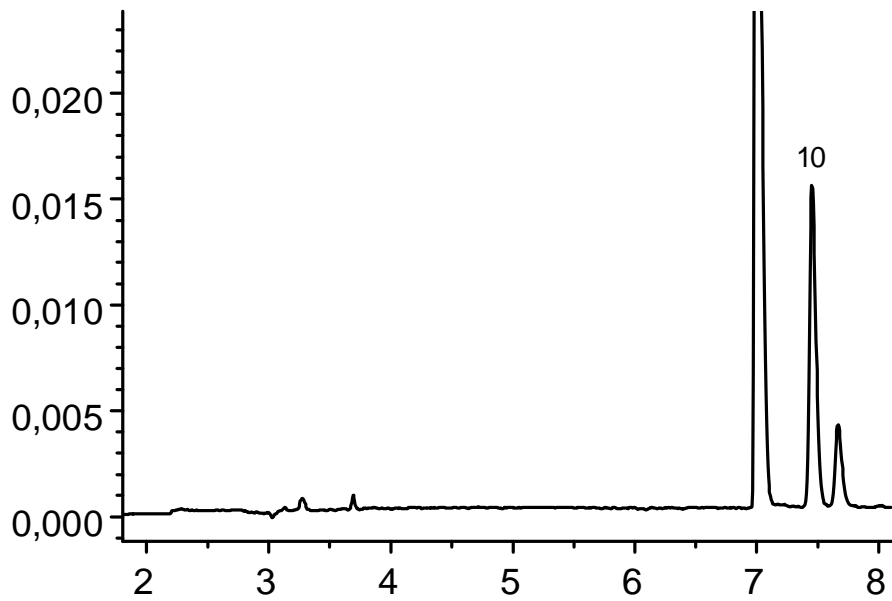


Abb.23: Chromatogramm eines mit Wasser verdünnten Vanille-Parfüms
 Zuordnung: 1 = Vanillin, 10 = Ethylvanillin
 (Meßbedingungen: siehe Abb.14)

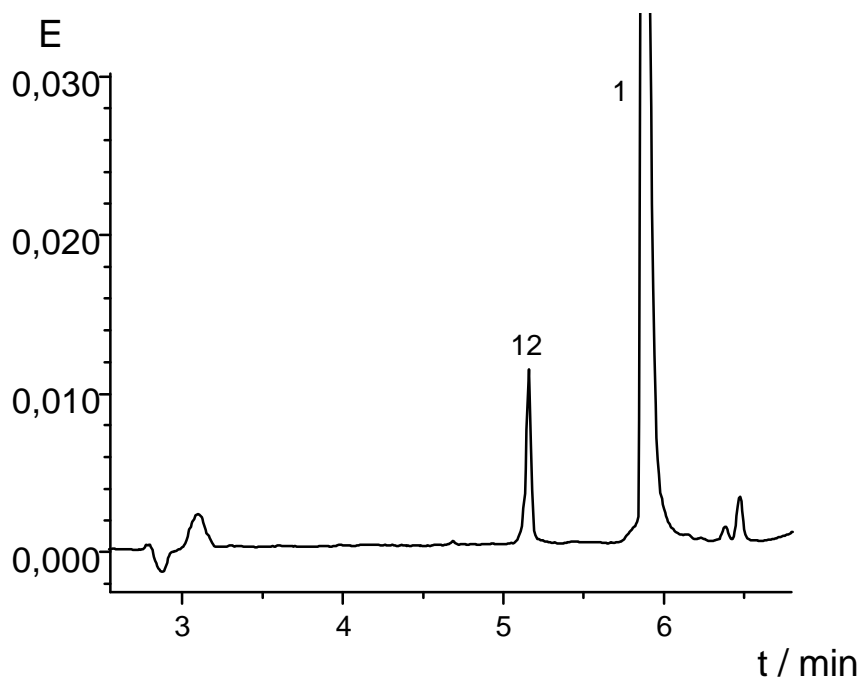


Abb.24: Chromatogramm des wäßrigen Extrakts von Butter-Vanille
 Zuordnung: 1 = Vanillin, 12 = Coumarin
 (Meßbedingungen: siehe Abb.14)

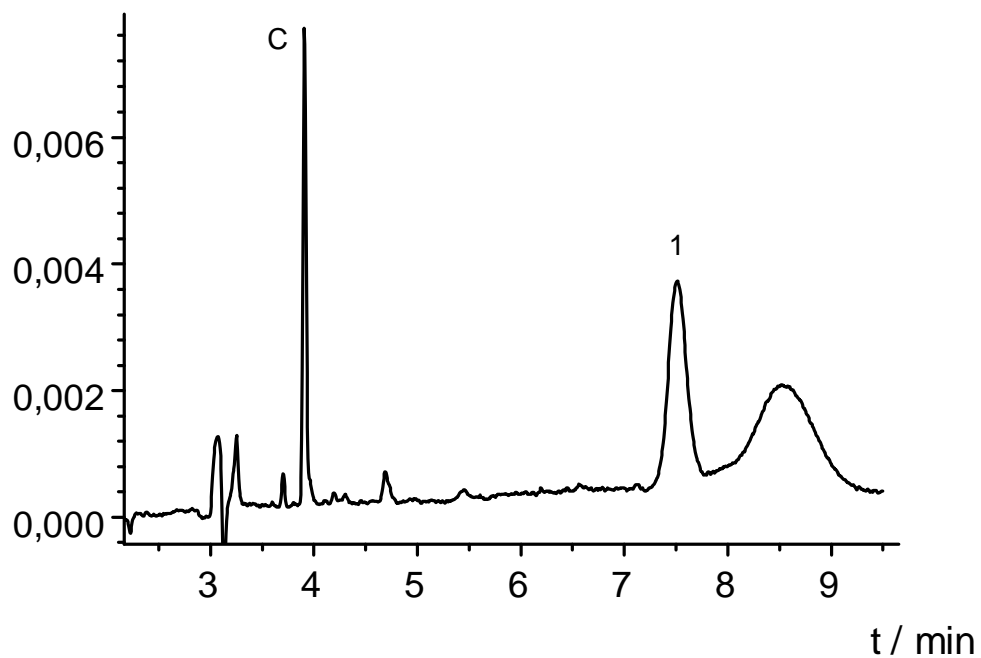


Abb.25: Chromatogramm des wäßrigen Extrakts eines aromatisierten Kaffees

Zuordnung: 1 = Vanillin, c = Koffein

(Meßbedingungen: siehe Abb.14)

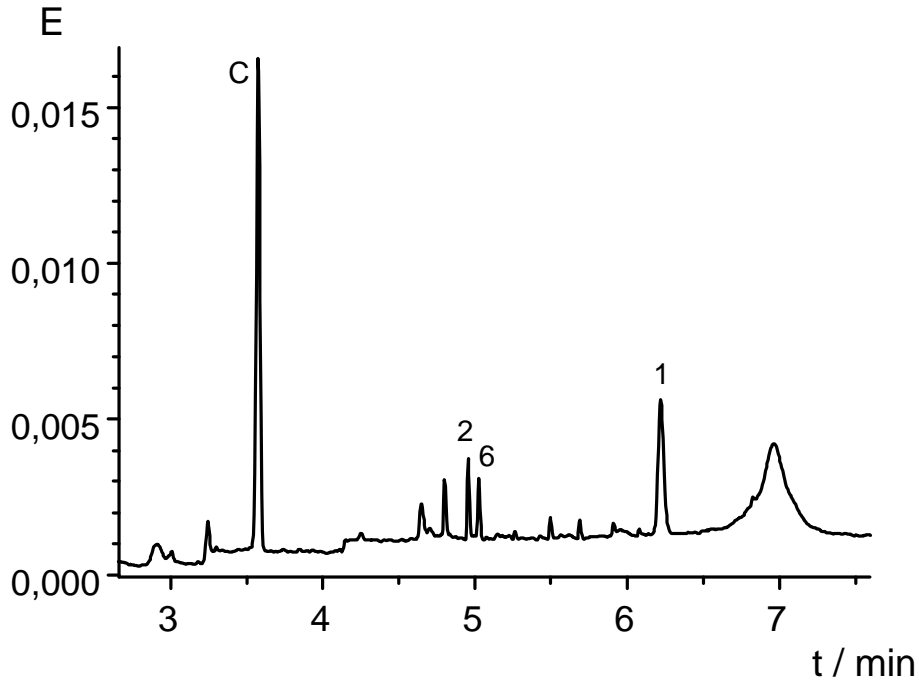


Abb.26: Chromatogramm des wäßrigen Extrakts eines aromatisierten Tees

Zuordnung: 1 = Vanillin, 2 = Vanillinsäure, 6 = 4-Hydroxybenzoesäure, c = Koffein

(Meßbedingungen: siehe Abb.14)

6 Wiederholpräzision

Um eine Aussage über die Wiederholpräzision, die bei Verwendung von kationischen Tensiden als Mizellenbildender Pufferbestandteil des Trennelektrolyten erreicht wird, treffen zu können, wurden die mit TTAB erzielten Ergebnisse mit der mit SDS erreichbaren Wiederholpräzision verglichen. Die Ermittlung der Daten zur Bestimmung der Wiederholpräzision wurden sowohl für eine synthetische Probe bestehend aus 12 sauren und neutralen Analyten als auch mit einer Realprobe, einer Probe eines käuflichen Vanilleextraktes, durchgeführt. Bei den Messungen mit SDS wurde zwischen den Läufen 0,5 min mit destilliertem Wasser gespült und anschließend die Kapillare 1,5 min mit dem Trennelektrolyten konditioniert. Für die Messungen mit TTAB wurde die Kapillare 0,5 min mit Salzsäure (0,1 mol/L) gereinigt und dann ebenfalls 1,5 min mit Trennelektrolyt konditioniert.

Kleine Veränderungen in der elektroosmotischen Mobilität μ_{eo} , die durch Änderung des pH-Wertes des Trennelektrolyten aufgrund elektrolytischer Zersetzung hervorgerufen werden, mindern die erreichbare Wiederholpräzision. Für die relative Standardabweichung (RSD) der Retentionszeiten werden in der Literatur [31-33] Werte unter 2 % angegeben. Aufgrund von Varianzen bei der Injektion wird in der Literatur die Zugabe eines internen Standards bei der Quantifizierung empfohlen [32,33]. Typische Werte für die RSD bei der Quantifizierung unter Verwendung eines internen Standards liegen ebenfalls unterhalb von 2 %. Diese Wiederholpräzision ist ausreichend für die Routineanalyse.

Zur Ermittlung der Wiederholpräzision wurden zehn aufeinanderfolgende Messungen in Bezug auf Retentionszeit, Peakhöhe und -fläche ausgewertet.

Beide verwendeten Tenside sind für den Einsatz als Mizellenbildender Bestandteil des Trennelektrolyten geeignet. Mit beiden Tensiden werden vergleichbare Werte für die Wiederholpräzision bei der Trennung einer synthetischen Probe (Tab.11 und 12) und einer Realprobe (Tab. 13 und 14) erhalten.

Die erhaltenen RSD für die Retentionszeiten liegen für die Trennung einer synthetischen Probe bei beiden untersuchten Tensiden deutlich unterhalb von 1%.

Für die beiden verwendeten Tenside werden bei den durchgeführten Trennungen einer synthetischen Probe im Durchschnitt für die Peakfläche eine bessere RSD erhalten als für die Auswertung nach der Peakhöhe (Tab.11 und 12).

Die RSD-Werte für die Peakfläche liegen ohne Internen Standard für die synthetische Probe mit 1,1 bis 2,2% für TTAB und mit 1,2 bis 3,4% für SDS in einem Bereich, der für Routineuntersuchungen ausreichend ist. Wird ein interner Standard (hier Cumarin) in die Berechnung miteinbezogen, so wird in beiden Fällen für die Mehrzahl der Analyte eine Verbesserung der RSD beobachtet. Für einzelne verschlechtert sich die RSD aber auch durch Einbeziehung des Internen Standards. Dieser Effekt wird sowohl bei der Auswertung nach der Peakfläche als auch bei der Auswertung nach der Peakhöhe beobachtet.

In Abb.28 und 29 sind jeweils die erste und zehnte chromatographische Trennung der Bestandteile einer synthetischen Probe übereinandergelagert dargestellt.

Tab.11: Relative Standardabweichung (RSD) % für die Retentionszeiten (t_R), die Peakfläche und -höhe für die Trennung einer Vanille-Standardprobe

Analytzuordnung: siehe Abb.28

(Meßbedingungen: siehe Abb.14; Trennelektrolyt: $c(\text{TTAB}) = 100 \text{ mmol/L}$; $c(\text{H}_3\text{BO}_3) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7) = 10 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 9,0$)

Analyt	t_R	Fläche	Höhe	Interner Standard	
				Fläche	Höhe
4	0,3	1,8	1,5	1,6	3,8
7	0,3	2,1	1,6	2,0	3,9
3	0,4	2,0	2,8	2,3	1,4
2	0,4	1,9	2,4	2,0	1,2
6	0,4	2,1	2,6	1,8	1,5
11	0,4	2,2	2,5	2,5	0,7
12	0,4	1,1	2,6	----- ^a	----- ^a
9	0,4	2,2	3,0	1,3	0,8
5	0,5	1,1	3,5	1,5	1,4
1	0,5	1,3	3,3	1,3	1,4
8	0,5	1,4	3,1	1,3	1,9
10	0,5	2,1	3,3	2,1	1,5

^a = interner Standard

Tab.12: Relative Standardabweichung (RSD) % für die Retentionszeiten (t_R), die Peakfläche und -höhe für die Trennung einer Vanille-Standardprobe

Analytzuordnung: siehe Abb.28

(Meßbedingungen: siehe Abb.14; Trennelektrolyt: $c(\text{SDS}) = 100 \text{ mmol/L}$; $c(\text{H}_3\text{BO}_3) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7) = 10 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 9,0$)

Analyt	t_R	Fläche	Höhe	Interner Standard	
				Fläche	Höhe
7	0,1	3,4	4,5	2,9	1,5
4	0,2	2,5	3,7	2,1	1,7
10	0,1	2,3	2,3	1,0	2,7
1	0,3	2,2	2,2	0,8	2,8
8	0,2	1,8	2,7	0,9	2,5
5	0,2	2,9	2,2	2,6	3,1
2	0,2	1,8	1,7	0,8	5,4
6	0,3	2,2	1,7	1,9	5,5
11	0,3	2,7	4,9	1,8	1,4
12	0,1	1,2	5,1	0,9	1,2
9	0,2	1,2	4,3	----- ^a	----- ^a
3	0,2	2,1	1,6	1,3	3,7

^a = interner Standard

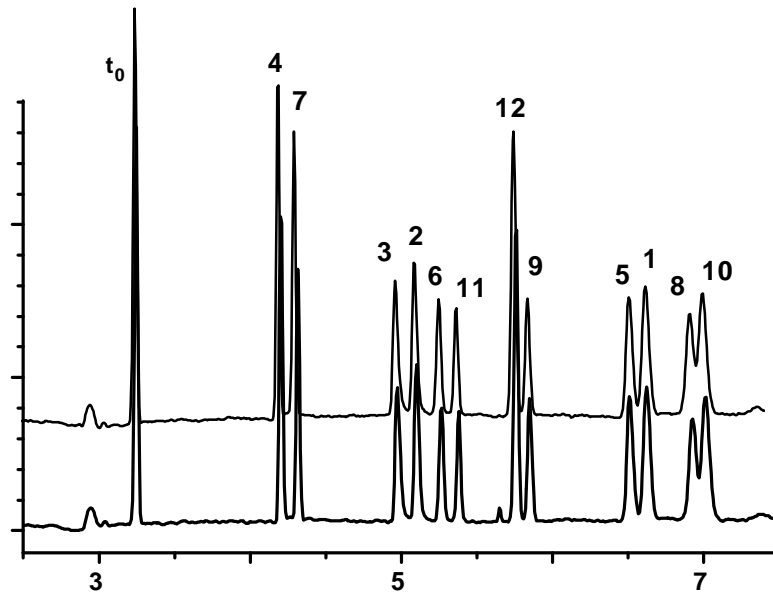


Abb.27: Überlagerung des ersten und zehnten chromatographischen Laufs der synthetischen Probe
 Peakzuordnung: 1 = Vanillin; 2 = Vanillinsäure; 3 = 3,4-Dihydroxybenzoesäure; 4 = 4-Hydroxy-3-methoxy-benzylalkohol; 5 = 4-Hydroxybenzaldehyd; 6 = 4-Hydroxybenzoesäure; 7 = 4-Hydroxybenzylalkohol; 8 = 4-Methoxybenzoesäure; 9 = 4-Methoxybenzaldehyd; 10 = Ethylvanillin; 11 = Piperonal; 12 = Cumarin
 (Meßbedingungen: siehe Abb.14; Trennelektrolyt: $c(\text{TTAB}) = 100 \text{ mmol/L}$; $c(\text{H}_3\text{BO}_3) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7) = 10 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 9,0$)

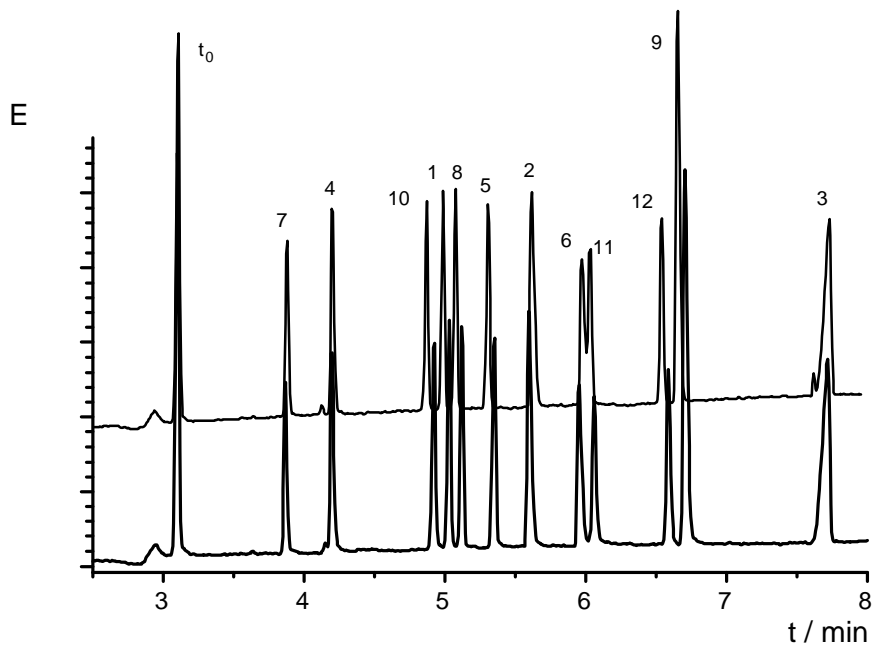


Abb.28: Überlagerung des ersten und zehnten chromatographischen Laufs der synthetischen Probe
 Peakzuordnung: siehe Abb.27
 (Meßbedingungen: siehe Abb.14; Trennelektrolyt: $c(\text{SDS}) = 100 \text{ mmol/L}$; $c(\text{H}_3\text{BO}_3) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7) = 10 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 9,0$)

Bei der Realprobe wird im Falle des 4-Hydroxybenzaldehyds (5), dessen Signal beim Einsatz von TTAB als Mizellenbildner nicht vom Signal des Vanillins (1) basisliniengetrennt detektiert werden kann (Abb.29), die hohe Trennleistung der MEKC deutlich. Die RSD-Werte liegen bei Verwendung von TTAB als Mizellenbildner für 4-Hydroxybenzaldehyd ohne Internen Standard bei 3,5 % für die Peakfläche und bei 3,2 % für die Peakhöhe. Nach Einbeziehung des Internen Standards verbessert sich der Wert für die Höhe auf 2,1 %, aber gleichzeitig verschlechtert sich der Wert für die Fläche auf 3,9 %. Die RSD-Werte liegen für beide Tenside bei der Auftrennung einer Realprobe vereinzelt schlechter als für die Standardprobe. Die Werte liegen bei Verwendung von TTAB für die Fläche ohne Internen Standard zwischen 0,7 und 5,2 und für die Peakhöhe zwischen 2,3 und 3,7% (Tab.13). Für die Verwendung von SDS zwischen 0,8 und 3,1 % für die Peakfläche und 0,8 und 1,9 % für die Peakhöhe. 4-Hydroxybenzaldehyd liefert bei der Trennung mit SDS für die Auswertung nach der Peakhöhe einen Ausreißerwert von 18,5 %. Die Berechnung über den Internen Standard (hier Cumarin) liefert für die Auswertung nach der Peakfläche wie auch im Falle der synthetischen Probe nur teilweise eine Verbesserung. Bei der Peakhöhe wird dagegen durchweg eine Verbesserung beim Einsatz des Internen Standards erhalten. Für beide Tenside liegt die RSD für die Auswertung nach der Peakfläche insgesamt günstiger als für die Peakhöhe. In Abb. 29 und 30 sind für die Analyse der Realprobe jeweils der erste und zehnte chromatographische Lauf übereinandergelagert dargestellt.

Tab.13: Relative Standardabweichung (RSD) % für die Retentionszeiten (t_R), die Peakfläche und -höhe für die Trennung des Vanille-Extrakts

Analytzuordnung: siehe Abb.19

(Meßbedingungen: siehe Abb.14; Trennelektrolyt: $c(\text{TTAB}) = 100 \text{ mmol/L}$; $c(\text{H}_3\text{BO}_3) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7) = 10 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 9,0$)

				Interner Standard	
Analyt	t_R	Fläche	Höhe	Fläche	Höhe
2	0,4	1,7	3,3	1,4	1,4
6	0,3	3,0	3,7	2,9	2,1
5	0,5	3,5	3,2	3,9	2,1
1	0,5	1,5	2,3	0,9	0,6

Tab.14: Relative Standardabweichung (RSD) % für die Retentionszeiten (t_R), die Peakfläche und -höhe für die Trennung des Vanille-Extrakts

Analytzuordnung: siehe Abb.19

(Meßbedingungen: siehe Abb.14; Trennelektrolyt: $c(\text{SDS}) = 100 \text{ mmol/L}$; $c(\text{H}_3\text{BO}_3) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7) = 10 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 9,0$)

				Interner Standard	
Analyt	t_R	Fläche	Höhe	Fläche	Höhe
1	0,6	0,8	0,8	0,3	2,0
5	0,6	2,7	1,6	2,3	2,1
2	0,6	1,3	1,9	1,0	2,8
6	0,7	3,1	18,5	3,1	17,4

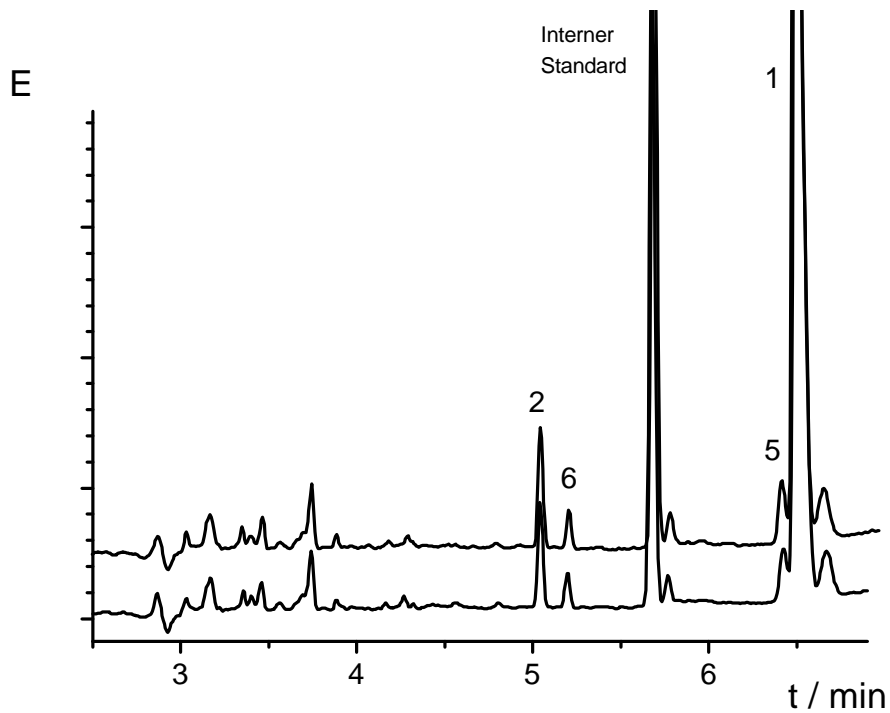


Abb.29: Überlagerung des ersten und zehnten chromatographischen Laufs des Vanille-Extrakts

Peakzuordnung: siehe Abb.19

(Meßbedingungen: siehe Abb.14; Trennelektrolyt: $c(\text{TTAB}) = 100 \text{ mmol/L}$; $c(\text{H}_3\text{BO}_3) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7) = 10 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 9,0$)

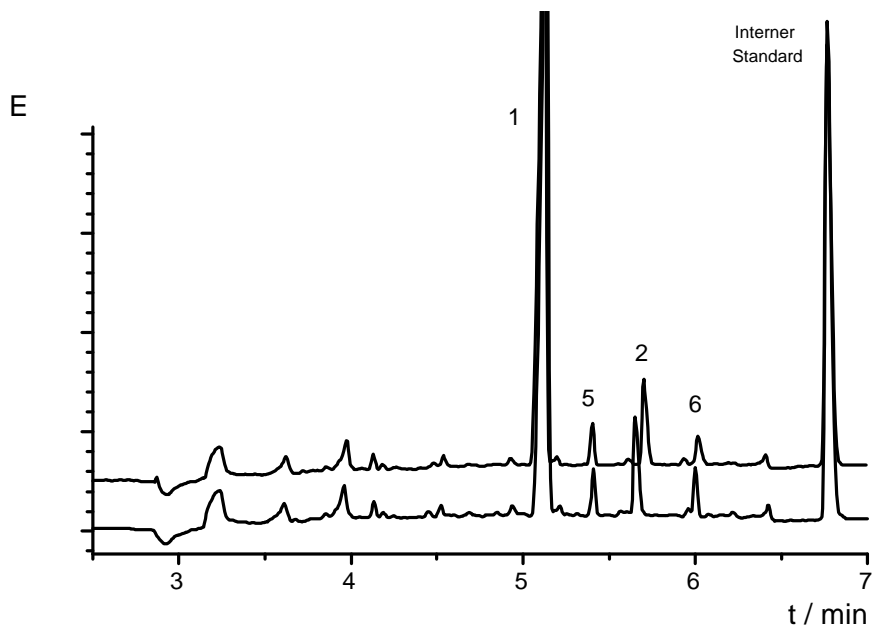


Abb.30: Überlagerung des ersten und zehnten chromatographischen Laufs des Vanille-Extrakts

Peakzuordnung: siehe Abb.19

(Meßbedingungen: siehe Abb.14; Trennelektrolyt: $c(\text{SDS}) = 100 \text{ mmol/L}$; $c(\text{H}_3\text{BO}_3) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7) = 10 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 9,0$)

7 Einsatz von Modifiern bei Verwendung kationischer Tenside

7.1 Einführung

Unter dem Einsatz eines Modifiers wird allgemein die Zugabe eines Stoffes zum Trennelektrolyten zur Verbesserung von Trennungen verstanden. Ein Ziel des Einsatzes von Modifiern in der MEKC ist es, den Quotienten t_{MC}/t_0 zu erhöhen. Ein weiteres Ziel kann darin bestehen, die Trennung unpolarer Analyte zu verbessern. Dieses Ziel wird durch eine Erniedrigung des Verteilungskoeffizienten zwischen mobiler wäßriger und pseudostationärer mizellarer Phase erreicht. Durch den Modifizierzusatz sollte die Durchflußzeit t_0 und damit die Analysenzeit nicht unnötig verlängert werden. Ebenfalls sollte der Einsatz eines Modifiers nicht zu einer Erhöhung der CMC des eingesetzten Tensids führen.

Bei Verwendung von SDS als mizellenbildendem Pufferbestandteil werden bevorzugt Acetonitril [34] und Harnstoff [35,36] als Modifier eingesetzt. Mit der Zugabe von Harnstoff zum Trennelektrolyten werden die Retentionsfaktoren der Analyte verringert. Zusätzlich wird das Verhältnis t_{MC}/t_0 erhöht, wobei gegenüber anderen Modifiern die Viskosität kaum verändert wird, was nur eine geringe Erniedrigung der elektroosmotischen Mobilität, somit eine geringe Erhöhung der Durchflußzeit t_0 und damit der Analysenzeit zur Folge hat. Der Einfluß von Acetonitril als Modifier auf die Retentionsfaktoren ist deutlich größer, so daß mit diesem Modifier die Retentionsfaktoren unpolarer Analyte in einen für die Trennung günstigeren Retentionbereich verschoben werden. Auch der gemeinsame Einsatz von Harnstoff und Acetonitril wird in der Literatur beschrieben [37].

7.2 Einsatz organischer Modifier

Anlehnend an die Ergebnisse, die mit SDS erzielt werden, wurden Acetonitril und Harnstoff auf ihre Eignung als Modifier bei Verwendung kationischer Tenside geprüft. Zur Vereinfachung wurde bei allen Messungen die mit Zugabe von Modifiern durchgeführt wurden, eine repräsentative Auswahl an Testanalyten ausgewählt.

So wurden als Testanalyte neben Thioharnstoff (Durchflusszeitmarker) und Sudan III (Marker der Retentionszeit der Mizellen), noch die sehr polaren Analyte 3-Methoxy-4-hydroxybenzylalkohol und die mit einem Dissoziationsgrad abhängig vom pH-Wert des Trennelektrolyten vorliegenden Analyte Vanillinsäure und 3,4-Dihydroxybenzoesäure, die phenolischen Verbindungen 4-Hydroxybenzaldehyd und Vanillin, sowie die Neutralverbindungen Piperonal und Cumarin gewählt.

Die Untersuchungen wurden mit einem Trennelektrolyten (pH = 9) durchgeführt, der TTAB in einer Konzentration von $c = 40 \text{ mmol/L}$ und einem Modifier in veränderlicher Konzentration enthielt.

Wie sich zeigte, ist der Einfluß der Modifier auf den Quotienten t_{MC}/t_0 bzw. das Retentionsfenster bei Zugabe von Acetonitril bis zu einem Volumenanteil von 15 % oder 3 mol/L Harnstoff nur marginal. In keinem Fall ist eine Vergrößerung der Mobilität der Mizellen μ_{MC} zu beobachten. Die geringe beobachtete Verbesserung des Quotienten t_{MC}/t_0 ist vornehmlich auf die Abnahme der elektroosmotischen Mobilität μ_{eo} zurückzuführen (Tab.15).

Analoge Ergebnisse wurden bei der Zugabe von Dimethylformamid (DMF) und Dimethylsulfoxid (DMSO) ($\varphi = 0\text{-}15 \%$) zum Trennelektrolyten erhalten. Bei Zugabe von Ethanol zum Trennelektrolyten ist sowohl eine Abnahme der elektroosmotischen Mobilität μ_{eo} als auch der Mobilität der Mizellen μ_{MC} (Tab.15) zu beobachten. Diese Beobachtung läßt sich mit einer Erhöhung der Viskosität des Trennelektrolyten erklären. Nachteilig bei der Zugabe von Ethanol als Modifier ist, daß der Quotient t_{MC}/t_0 sich nicht verbessert, dabei aber eine deutliche Erhöhung der Durchflußzeit t_0 von 2,9 auf 4,8 min und damit der gesamten Analysendauer zu beobachten ist.

Der Einsatz organischer Modifier ist daher bei Verwendung kationischer Tenside ungeeignet, um durch Erhöhung des Quotienten t_{MC}/t_0 zu einer Verbesserung bei Trennproblemen beizutragen.

7 Einsatz von Modifiern bei Verwendung eines kationischen Tensids

Tab.15: Elektroosmotische Mobilität μ_{eo} , elektrophoretische Mobilität der Mizellen μ_{MC} , sowie der Quotient t_{MC}/t_0 in Abhängigkeit von der Zugabe eines organischen Modifiers (c_{mod} = Modifikonzentration, ϕ_{mod} = Volumenanteil des Modifiers)
(Meßbedingungen: Trennelektrolyt: $c(TTAB) = 40 \text{ mmol/L}$; $c(H_3BO_3) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(Na_2B_4O_7) = 10 \text{ mmol/L}$, $pH = 9,0$; Kapillare: $75 \text{ } \mu\text{m}$ I.D., 50 cm effektive Länge, 57 cm Gesamtlänge; Analysenspannung 25 kV ; Temperatur 25°C ; Probenaufgabe Druckinjektion 2 s)

Modifizier	$c_{mod} / (\text{mol/L})$	$\phi_{mod} / (\%)$	$\mu_{eo} / (10^{-3} \text{ cm}^2/\text{Vs})$	$\mu_{MC} / (10^{-3} \text{ cm}^2/\text{Vs})$	t_{MC}/t_0
Acetonitril		0	-0,66	0,37	2,3
Acetonitril		5	-0,64	0,36	2,3
Acetonitril		10	-0,61	0,36	2,4
Acetonitril		15	-0,60	0,36	2,5
Harnstoff	0		-0,66	0,36	2,2
Harnstoff	1		-0,64	0,36	2,2
Harnstoff	2		-0,61	0,35	2,3
Harnstoff	3		-0,60	0,34	2,3
Ethanol		0	-0,66	0,37	2,3
Ethanol		5	-0,55	0,31	2,3
Ethanol		10	-0,48	0,27	2,3
Ethanol		15	-0,40	0,24	2,4

Bei der Betrachtung der in Abhängigkeit vom Gehalt an Modifizier im Trennelektrolyten logarithmisch aufgetragenen Retentionsfaktoren der Neutralverbindungen (Cumarin und Piperonal) (Abb.31) wird deutlich, daß analog zur Verwendung von SDS als Mizellenbildner die Retentionsfaktoren mit zunehmenden Modifiziergehalt annähernd linear abnehmen.

7 Einsatz von Modifiern bei Verwendung eines kationischen Tensids

Eine lineare Abnahme der logarithmierten Retentionsfaktoren für Neutralverbindungen mit zunehmenden Volumenanteil (bzw. Stoffmengenkonzentration) Modifier ist sowohl in der Umkehrphasen Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) [38] als auch in der MEKC [36] beschrieben. Diese Tatsache zeigt die Vergleichbarkeit der beiden chromatographischen Trenntechniken.

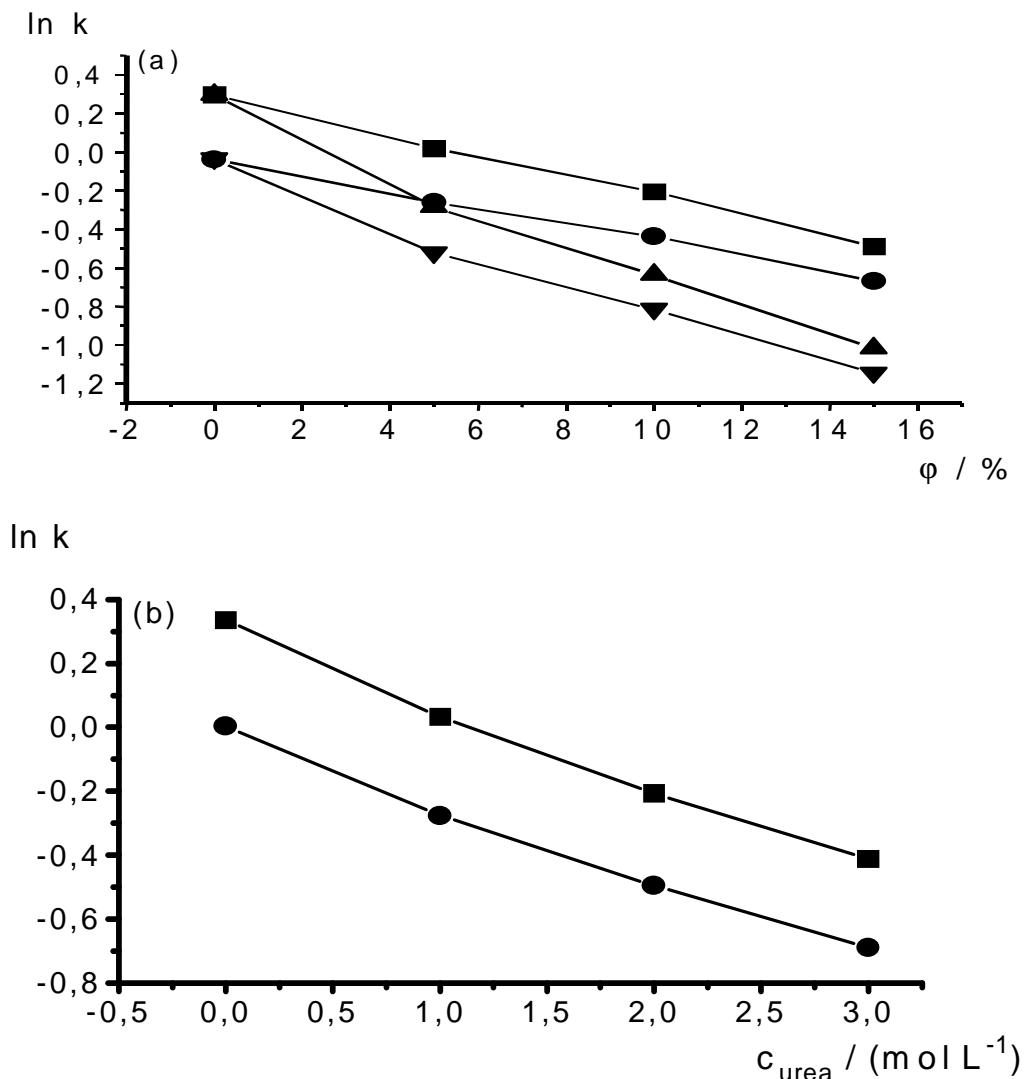


Abb.31: Auftragung des Logarithmus der Retentionsfaktoren neutraler Analyte gegen (a) den Volumenanteil Acetonitril (● = Piperonal, ■ = Cumarin) und Dimethylformamide (▼ = Piperonal, ▲ = Cumarin); (b) die Konzentration Harnstoff im Trennelektrolyten (● = Piperonal, ■ = Cumarin)

(Meßbedingungen: Trennelektrolyt: $c(\text{TTAB}) = 40 \text{ mmol/L}$; $c(\text{H}_3\text{BO}_3) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7) = 10 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 9,0$; Kapillare: $75 \text{ }\mu\text{m}$ I.D., 50 cm effektive Länge, 57 cm Gesamtlänge; Analysenspannung 25 kV ; Temperatur 25°C ; Probenaufgabe: Druckinjektion 2 s)

7.3 Einsatz quartärer Ammoniumverbindungen

Bei anionischen Tensiden wie SDS ist der Einsatz von Tetraalkylammonium-Salzen zur Bildung von Ionenpaaren mit den Analyt-Ionen und zur Änderung der Selektivität durch Veränderung der Mizellenstruktur bekannt [39].

Bei der Zugabe von quartären Ammoniumverbindungen zu Trennelektrolyten, die ein kationisches Tensid enthalten, ist nicht die Bildung von Ionenpaaren zu erwarten, vielmehr konkurrieren die ionischen Modifier mit den Tensid-Monomeren um die Positionen an der Kapillareninnenwand und beeinflussen damit den EOF. Zusätzlich zu diesem Effekt konkurrieren die quartären Ammoniumverbindungen mit den Tensid-Monomeren bei der Bildung von Ionenpaaren um die dissoziierten, negativ geladenen Analyte.

Auf ihre Einsatzfähigkeit als Modifier bei Verwendung kationischer Tenside als Mizellenbildner wurden Tetrabutylammoniumbromid (TBAB), das kurzkettige kationische Tensid Octyltrimethylammoniumbromid (OTAB) und Hexan-1,6-bis-trimethylammoniumbromid (Hexamethoniumbromid, HMB) (Abb.32) getestet.

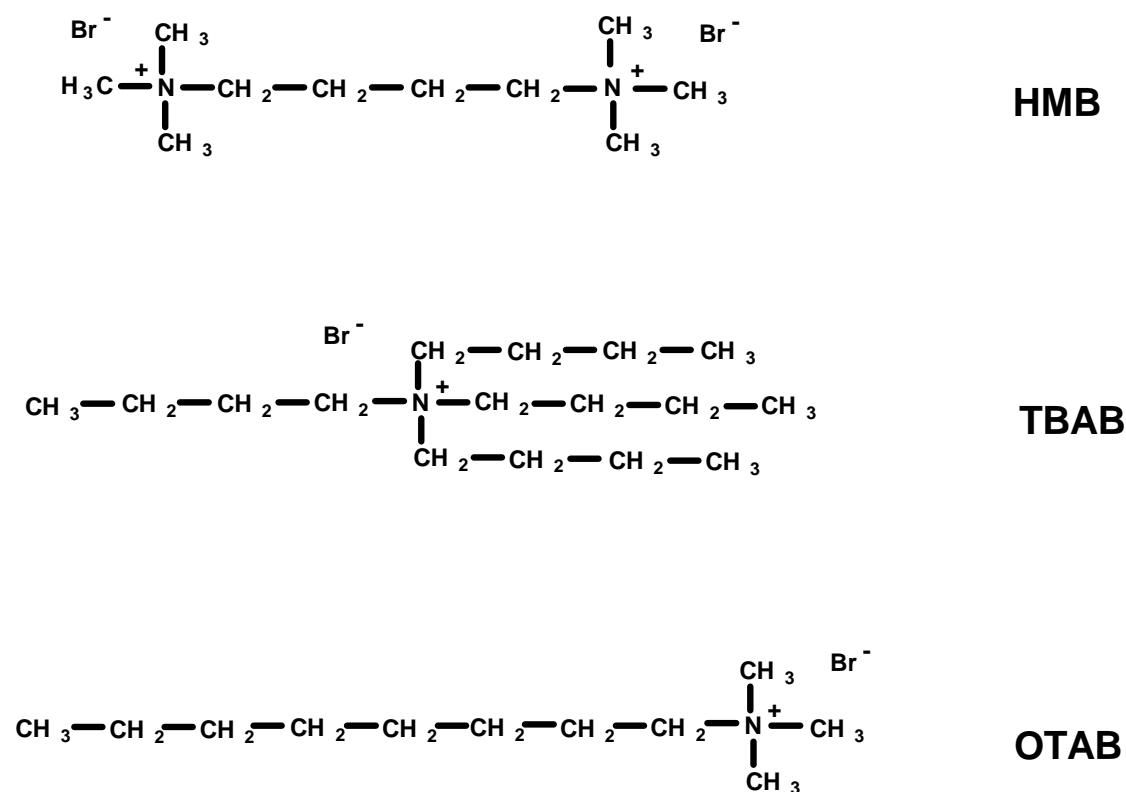


Abb.32: Bei Verwendung kationischer Tenside als Modifier eingesetzte quartäre Ammoniumverbindungen

HMB wird in der Kapillar-Zonenelektrophorese als EOF-Modifizier eingesetzt, da es starke Wechselwirkungen mit den negativ geladenen dissoziierten Silanol-Gruppen der Kapillarinnenwand zeigt.

Werden TBAB oder HMB einem Trennelektrolyten, der ein kationisches Tensid enthält, als Modifizier zugesetzt, konkurrieren diese mit den Tensid-Monomeren um die Positionen an der Kapillarinnenwand. Aufgrund ihrer räumlichen Struktur beanspruchen TBAB und HMB einen größeren Platz als die Tensid-Monomere, wodurch eine Veränderung der an der Kapillarinnenwand anhaftenden Doppelschicht (Hemimizelle) entsteht. Diese Veränderung der Hemimizellenstruktur sollte zu einer Abnahme der Ladungsdichte und damit der elektroosmotischen Mobilität μ_{eo} führen. Da bei Verwendung von HMB und TBAB, aufgrund ihrer Struktur, kein Einbau in die für die Trennung verantwortlichen Mizellen zu erwarten ist, sollte die elektrophoretische Mobilität der Mizellen μ_{MC} nahezu unverändert bleiben. Durch Zugabe quartärer Ammoniumverbindungen als Modifizier zum Trennelektrolyten, der ein kationisches Tensid enthält, ist daher eine deutliche Aufweitung des Retentionsfensters zu erwarten.

Der Einsatz eines kurzkettigen Tensids wie Octyltrimethylammoniumbromid (OTAB) als Modifizier soll nach CROSBY und EL RASSI [12] ebenfalls zu einer deutlichen Aufweitung des Retentionsfensters führen. Bei OTAB ist neben der Konkurrenzsituation um die Positionen an der Kapillarinnenwand, zusätzlich die Bildung von Mischmizellen mit TTAB zu erwarten. Durch den Einbau von OTAB, das aufgrund seiner hohen CMC von 140 mmol/L [12] selbst keine Mizellen bilden sollte, in die TTAB-Mizellen ist eine Verkleinerung der Mizellen und damit eine Erhöhung der Mobilität μ_{MC} zu erwarten. Beim Einsatz von OTAB als Modifizier, sollte die größte Aufweitung des Retentionsfensters zu erwarten sein.

Die Messungen wurden mit einem Trennelektrolyten, der TTAB als kationisches Tensid in einer Konzentration von $c = 40$ mmol/L und einen Modifizier veränderlicher Konzentration enthielt, durchgeführt. Um den Einfluß der quartären Ammoniumverbindungen bei unterschiedlichen pH-Werten zu ermitteln, wurde sowohl mit basischen (pH 9), als auch mit sauren (pH 4,6) Trennelektrolyten gearbeitet.

Die Konzentration der Modifier TBAB und OTAB wurde von 0-100 mmol/L variiert. Aufgrund der hohen Ionenstärke dieser Trennelektrolyten mußte die Trennspannung auf 15 kV reduziert werden, um Überhitzung aufgrund der JOULSchen Wärme zu vermeiden. Der Modifier HMB konnte daher nur bis zu einer Konzentration von 40 mmol/L dem Trennelektrolyten zugesetzt werden.

7.3.1 Zugabe von OTAB und TBAB

Die bei Zugabe des Modifiers OTAB bzw. TBAB zum Trennelektrolyten erhaltenen Daten für die elektroosmotische Mobilität μ_{eo} , die elektrophoretische Mobilität der Mizellen μ_{MC} und den Quotienten t_{MC}/t_0 sind in Tab.16 vergleichend aufgelistet. Unabhängig vom pH-Wert des Trennelektrolyten zeigt sich mit Zunahme des Modifiiergehalts eine deutliche Abnahme der elektroosmotischen Mobilität μ_{eo} . Ebenso ist eine Abnahme der elektrophoretischen Mobilität der Mizellen μ_{MC} bei Zunahme der Modifikerkonzentration zu beobachten. Bei Verwendung von TBAB und OTAB als Modifier ist die Abnahme von μ_{MC} nahezu identisch, aber deutlich größer als bei Verwendung von HMB als Modifier (Tab. 19). Dieser Unterschied ist nicht nur durch eine reine Erhöhung der Viskosität des Trennelektrolyten zu erklären, sondern es ist davon auszugehen, daß nicht nur beim Einsatz von OTAB sondern auch mit TBAB die Bildung von Mischmizellen möglich ist.

Bei einem pH von 9 resultiert eine Zunahme des Quotienten t_{MC}/t_0 von 2,2 auf 2,9 bei Zugabe von 100 mmol/L TBAB und bis auf 3,7 bei Zugabe von 100 mmol/L OTAB. Im sauren bei pH 4,6 ist der Effekt stärker ausgeprägt, so daß der Quotient t_{MC}/t_0 bei Zugabe von 80 mmol/L von TBAB von 2,9 auf 4,4 und bei Zugabe von 80 mmol/L OTAB auf 5,6 erhöht wird. Bei einer Zugabe von 100 mmol/L OTAB bzw. TBAB war es nicht möglich, die Retentionszeit der Mizellen zu bestimmen. Die höheren Werte des Quotienten t_{MC}/t_0 bei Verwendung von OTAB als Modifier resultieren aus der größeren Abnahme der elektroosmotischen Mobilität μ_{eo} im Vergleich zum Einsatz von TBAB.

7 Einsatz von Modifiern bei Verwendung eines kationischen Tensids

Tab.16: Elektroosmotische Mobilität μ_{eo} , elektrophoretische Mobilität der Mizellen μ_{MC} , sowie der Quotient t_{MC}/t_0 in Abhängigkeit von der Konzentration einer quartären Ammoniumverbindung als Modifier im Trennelektrolyten
(Meßbedingungen: siehe Tab.15)

Modifier	c (mmol/L)	μ_{eo} ($10^{-3} \text{ cm}^2/\text{Vs}$)	μ_{MC} ($10^{-3} \text{ cm}^2/\text{Vs}$)	t_{MC}/t_0
OTAB, pH 9,0	0	-0,64	0,35	2,2
	20	-0,52	0,31	2,4
	40	-0,45	0,29	2,7
	60	-0,40	0,28	3,3
	80	-0,37	0,26	3,5
	100	-0,34	0,25	3,7
OTAB, pH 4,6	0	-0,56	0,35	2,7
	20	-0,47	0,31	2,9
	40	-0,41	0,29	3,3
	60	-0,36	0,27	4,0
	80	-0,32	0,26	5,6
	100	-0,28	---- ^a	---- ^a
TBAB, pH 9,0	0	-0,64	0,35	2,2
	20	-0,52	0,31	2,4
	40	-0,46	0,28	2,5
	60	-0,42	0,26	2,6
	80	-0,39	0,25	2,8
	100	-0,36	0,24	2,9
TBAB, pH 4,6	0	-0,54	0,35	2,9
	20	-0,43	0,30	3,5
	40	-0,37	0,28	3,9
	60	-0,34	0,25	4,2
	80	-0,31	0,24	4,4
	100	-0,29	---- ^a	---- ^a

^a konnte nicht ermittelt werden

Bei Verwendung von TBAB als Modifier ist die Abnahme der Retentionsfaktoren stärker als beim Einsatz von OTAB, so daß auch hier eine Bestätigung für die Bildung von Mischmizellen von TTAB mit TBAB zu finden ist.

Die Einsatzmöglichkeit von TBAB oder OTAB zur Verbesserung einer Trennung können am Beispiel einer Trennung von Nitrotoluolen demonstriert werden. Als Trennelektrolyt wurde ein Puffer mit $\text{pH} = 4,6$ und einer Konzentration von 40 mmol/L TTAB (Abb. 33a) gewählt. Nach Zugabe von 100 mmol/L OTAB (Abb. 33b) bzw. 100 mmol/L TBAB konnte eine deutliche Verbesserung der Trennung festgestellt werden. Nachteilig ist die Zunahme der Durchflußzeit t_0 (bei OTAB von 5 auf 9 min) und die damit verbundene längere Analysendauer. Die Effizienz der Trennung bleibt erhalten. So liegen die berechneten Bodenzahlen für die Signale 1-6 bei der Trennung unter Verwendung von OTAB als Modifier zwischen 112000 und 160000. Durch Zugabe des Modifiers wird die Elutionsreihenfolge der neutralen Nitrotoluole nicht verändert.

Die Selektivität für neutrale Analyte wird durch Zugabe einer quartären Ammoniumverbindung nicht verändert. Diese Modifier haben aber einen drastischen Einfluß auf die Retention acider Analyte. Beispielhaft ist in Abb.34 die Trennung einiger ausgewählter neutraler und acider Bestandteile der Vanille bei $\text{pH} 9,0$ und 40 mmol/L TTAB mit 100 mmol/L OTAB als Modifier dargestellt.

Bei Zugabe von quartären Ammoniumverbindungen als Modifier zum Trennelektrolyten ist die Retention der partiell negativ geladenen Analyte (Vanillinsäure, 3,4-Dihydroxybenzoesäure, 4-Hydroxybenzaldehyd und Vanillin) drastisch reduziert (Tab.17), eine Änderung der Elutionsreihenfolge ist die Folge (Abb.34). Für Vanillinsäure und 3,4-Dihydroxybenzoesäure ist der Einfluß so stark, daß diese vor dem EOF-Marker Thioharnstoff eluiert werden. Mit zunehmender Modifikonzentration ist ebenfalls eine Abnahme des Retentionsfaktors k der neutralen Analyte Piperonal und Cumarin (Tab.17) zu beobachten.

Diese Abnahme läßt sich durch die Bildung von Mischmizellen von TTAB mit TBAB erklären. Die Bildung von Mischmizellen nimmt Einfluß auf das Verteilungsgleichgewicht zwischen der wäßrigen und der mizellaren Phase, wodurch die Retention der neutralen Analyte vermindert wird.

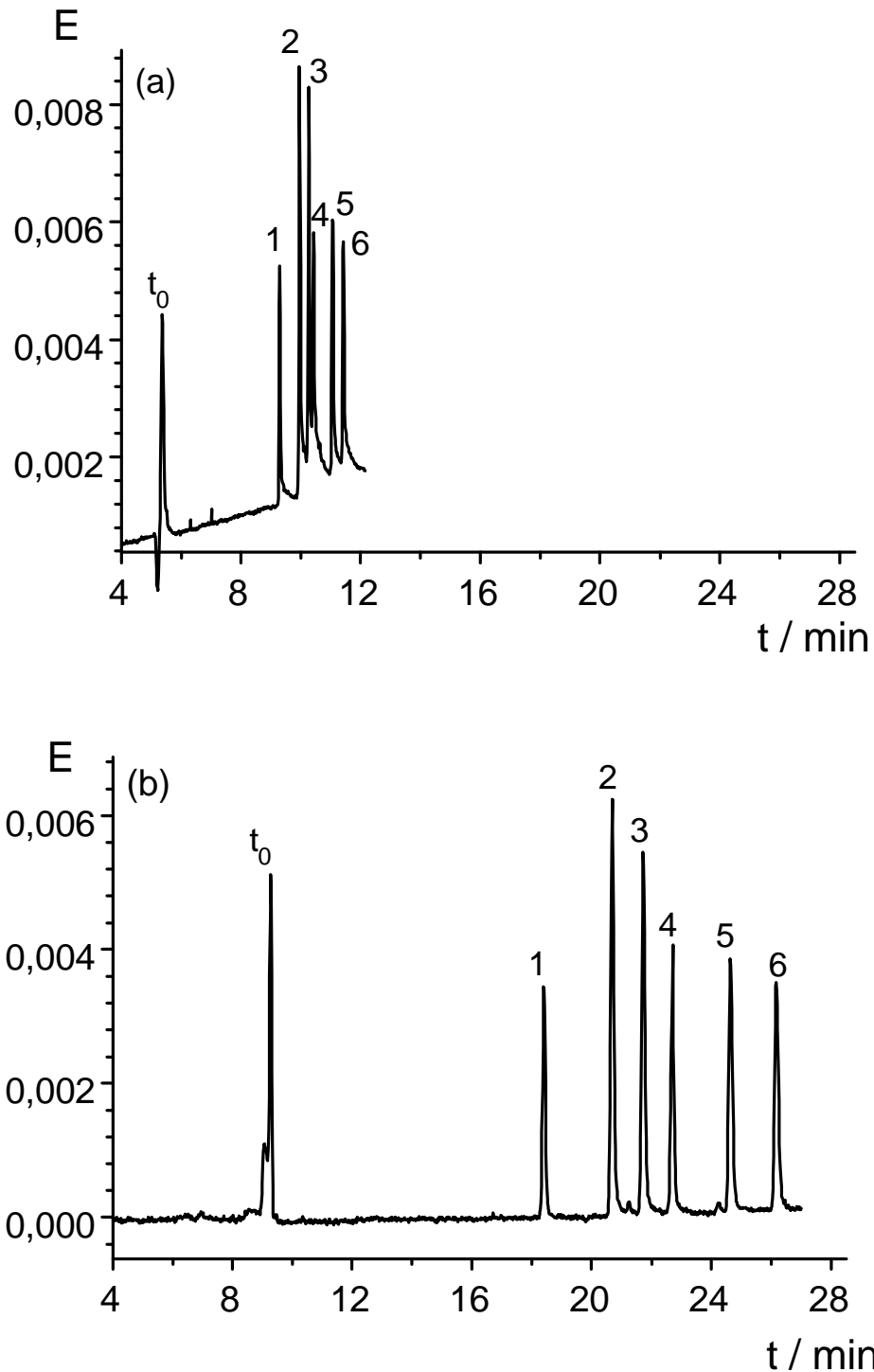


Abb.33: Trennung von Nitrotoluolen ((a) ohne Modifier, (b) $c(\text{OTAB}) = 100 \text{ mmol/L}$)

Peak-Zuordnung: 1 = 2,4,6-Trinitrotoluol, 2 = 2,5-Dinitrotoluol, 3 = 2,4-Dinitrotoluol, 4 = 2,6-Dinitrotoluol, 5 = 3,4-Dinitrotoluol, 6 = 2,3-Dinitrotoluol

(Meßbedingungen: Trennelektrolyt: $c(\text{TTAB}) = 40 \text{ mmol/L}$; $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(\text{CH}_3\text{COONa}) = 10 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 4,6$; (a) ohne Modifier; (b) $c(\text{OTAB}) = 100 \text{ mmol/L}$; Kapillare: $75 \mu\text{m}$ I.D., 50 cm effektive Länge, 57 cm Gesamtlänge; Analysenspannung 25 kV ; Temperatur 25°C ; Probenaufgabe: Druckinjektion 2 s)

7 Einsatz von Modifiern bei Verwendung eines kationischen Tensids

Bei pH 4,6 ist der beschriebene Effekt der Beeinflussung der Retention der partiell negativ geladenen Analyte bei Zugabe quartärer Ammoniumverbindungen als Modifier in abgeschwächter Form immer noch feststellbar, wobei nur die Analyte mit einem pK_S -Wert < 5 (Vanillinsäure $pK_S = 4,52$ (25° C, in Wasser) [40] und 3,4-Dihydroxybenzoesäure $pK_S = 4,48$ (25° C, in Wasser) [41]) betroffen sind. Die phenolischen Analyte (Vanillin und 4-Hydroxybenzaldehyd) mit einem pK_S -Wert > 8 verhalten sich wie neutrale Analyte (Tab.18). Die Änderung der Elutionsreihenfolge ist dann auf die aciden Verbindungen (Vanillinsäure und 3,4-Dihydroxybenzoesäure) beschränkt (Abb.35).

Tab.17: Pseudo-Retentionsfaktor k^* für ausgewählte Analyte bei Zugabe von TBAB als Modifier für pH = 9,0

(Meßbedingungen: siehe Abb.32; Trennelektrolyt: $c(\text{TTAB}) = 40 \text{ mmol/L}$; $c(\text{H}_3\text{BO}_3) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7) = 10 \text{ mmol/L}$, pH = 9,0)

$c_{\text{TBAB}} / (\text{mmol/L})$	0	20	40	60	80	100
Analyt						
Piperonal	1,00	0,92	0,89	0,84	0,82	0,78
Cumarin	1,41	1,27	1,21	1,15	1,10	1,04
4-Hydroxybenzaldehyd	5,31	2,01	1,06	0,60	0,36	0,19
Vanillin	6,01	2,28	1,21	0,71	0,45	0,26
Vanillinsäure	1,90	0,31	-0,06	-0,22	-0,29	-0,34
3,4-Dihydroxybenzoesäure	2,25	0,20	---- ^a	-0,39	-0,46	-0,51

^a = nicht bestimmt

Tab.18: Pseudo-Retentionsfaktor k^* für ausgewählte Analyte bei Zugabe von TBAB als Modifier für pH = 4,6

(Meßbedingungen: siehe Abb.32; Trennelektrolyt: $c(\text{TTAB}) = 40 \text{ mmol/L}$; $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(\text{CH}_3\text{COONa}) = 10 \text{ mmol/L}$, pH = 4,6)

$c_{\text{TBAB}} / (\text{mmol/L})$	0	20	40	60	80
Analyt					
Piperonal	1,00	0,92	0,88	0,85	0,83
Cumarin	1,40	1,22	1,13	1,07	1,03
4-Hydroxybenzaldehyd	1,62	1,54	1,46	1,41	1,37
Vanillin	1,39	1,28	1,21	1,16	1,12
Vanillinsäure	1,68	0,61	0,31	0,18	0,10
3,4-Dihydroxybenzoesäure	1,68	0,67	0,37	0,23	0,16

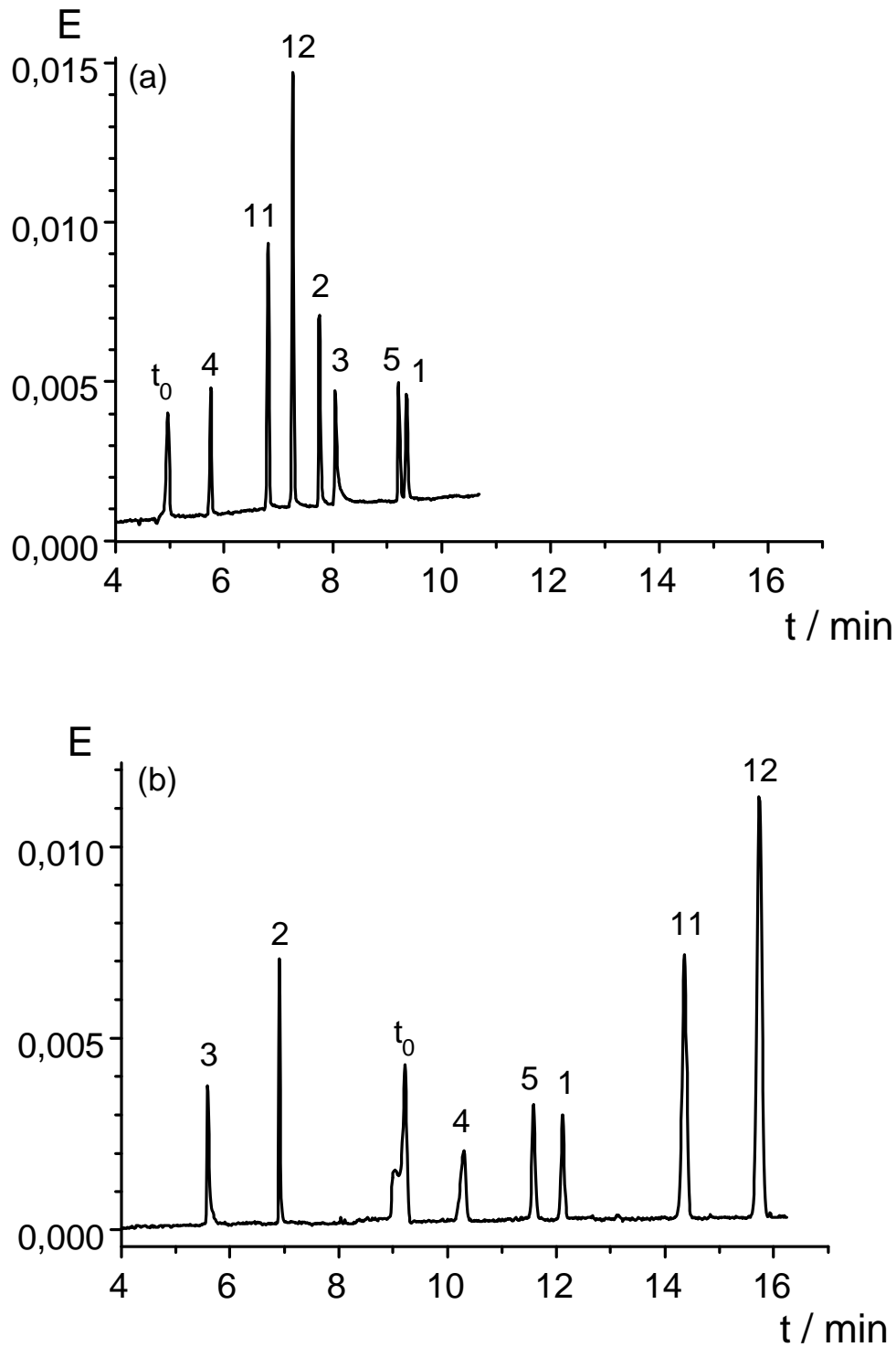


Abb.34: Trennung von neutralen und aciden Analyten ((a) ohne Modifier; (b) $c(\text{OTAB}) = 100 \text{ mmol/L}$ bei $\text{pH} = 9,0$)

Peak-Zuordnung: 1 = Vanillin, 2 = Vanillinsäure, 3 = 3,4-Dihydroxybenzoesäure, 4 = 4-Hydroxy-3-methoxybenzylalkohol, 5 = 4-Hydroxybenzaldehyd, 11 = Piperonal, 12 = Cumarin

(Meßbedingungen: siehe Abb.33; Trennelektrolyt: $c(\text{H}_3\text{BO}_3) = 10 \text{ mmol/L}$; $c(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7) = 10 \text{ mmol/L}$; $\text{pH} 9,0$)

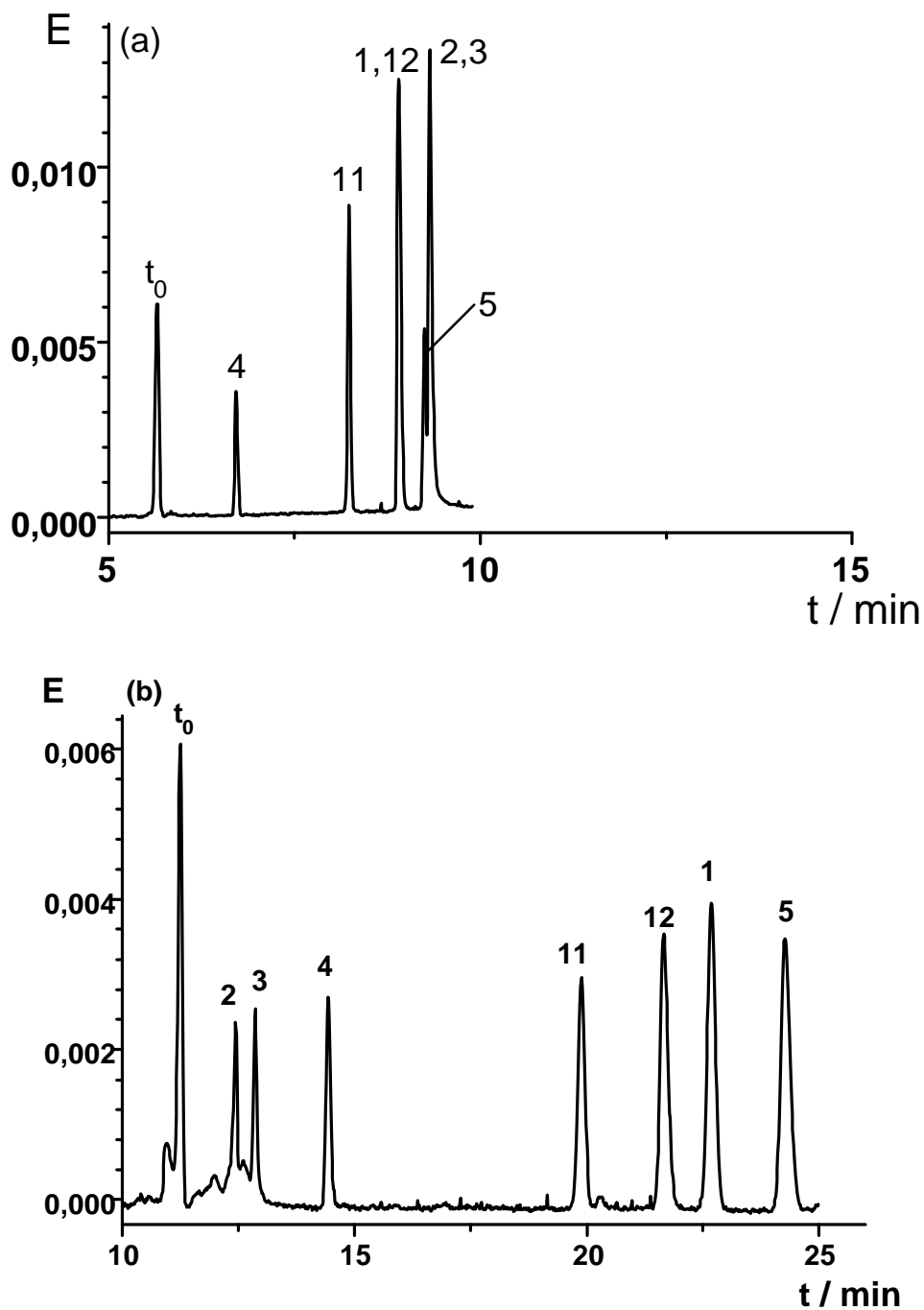


Abb.35: Trennung von neutralen und aciden Analyten ((a) ohne Modifier; (b) $c(\text{OTAB}) = 100 \text{ mmol/L}$) bei $\text{pH} = 4,6$

Peak-Zuordnung: siehe Abb.34

(Meßbedingungen: siehe Abb.33; Trennelektrolyt: ($c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 10 \text{ mmol/L}$; $c(\text{CH}_3\text{COONa}) = 10 \text{ mmol/L}$; $\text{pH} 4,6$)

7.3.2 Zugabe von HMB

Die bei Zugabe des Modifiers HMB zum Trennelektrolyten erhaltenen Daten für die elektroosmotische Mobilität μ_{eo} , die elektrophoretische Mobilität der Mizellen μ_{MC} und den Quotienten t_{MC}/t_0 sind in Tab.19 wiedergegeben. Mit steigender Konzentration an Hexamethoniumbromid (HMB) ist analog zu den Ergebnissen mit TBAB und OTAB eine Abnahme der elektroosmotischen Mobilität μ_{eo} festzustellen. Die leichte Abnahme der elektrophoretischen Mobilität der Mizellen μ_{MC} ist mit einer Viskositätserhöhung des Trennelektrolyten nach Zugabe von HMB zu erklären. Die Erniedrigung von μ_{MC} kompensiert zwar teilweise den Gewinn durch die Erniedrigung von μ_{eo} , insgesamt resultiert aber eine deutliche Aufweitung des Retentionsfensters durch die Modifierzugabe.

Der Quotient t_{MC}/t_0 vergrößert sich bei pH 9,0 von 2,2 auf 3,1 durch Zugabe von 40 mmol/L HMB und von 2,9 auf 5,3 bei pH 4,6. Beim Einsatz von HMB ist damit keine Verbesserung gegenüber dem Einsatz von TBAB und OTAB als Modifier festzustellen.

Tab.19: Elektroosmotische Mobilität μ_{eo} , elektrophoretische Mobilität der Mizellen μ_{MC} , sowie der Quotient t_{MC}/t_0 in Abhängigkeit von der Zugabe von Hexamethoniumbromid als Modifier (Meßbedingungen: siehe Abb.33; Trennelektrolyt: $c(\text{TTAB}) = 40 \text{ mmol/L}$; $c(\text{H}_3\text{BO}_3) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7) = 10 \text{ mmol/L}$, ;pH 9,0; $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(\text{CH}_3\text{COONa}) = 10 \text{ mmol/L}$, pH = 4,6; $c(\text{TBAB}) = \text{variabel}$)

pH	c / (mmol/L)	$\mu_{eo} / (10^{-3} \text{ cm}^2/\text{Vs})$	$\mu_{MC} / (10^{-3} \text{ cm}^2/\text{Vs})$	t_{MC}/t_0
9,0	0	-0,63	0,35	2,2
	10	-0,55	0,33	2,5
	20	-0,50	0,31	2,7
	30	-0,46	0,30	2,9
	40	-0,43	0,29	3,1
4,6	0	-0,54	0,35	2,9
	10	-0,46	0,33	3,5
	20	-0,42	0,31	3,9
	30	-0,39	0,30	4,6
	40	-0,36	0,29	5,3

7 Einsatz von Modifiern bei Verwendung eines kationischen Tensids

Der Einfluß auf die Trennung von neutralen Analyten (Piperonal und Cumarin) entspricht dem Einfluß von TBAB oder OTAB. Beispielhaft ist die Trennung von Nitrotoluolen bei pH 4,6 mit 40 mmol/L TTAB ohne und mit 40 mmol/L HMB im Trennelektrolyten dargestellt (Abb.36). Mittels Modifier gelingt es, die unzureichend aufgelösten Peaks besser zu trennen, wobei eine Änderung der Elutionsreihenfolge nicht zu beobachten ist. Die Effizienz der Trennung bleibt erhalten, die berechneten Trennstufenzahlen bei Verwendung von HMB als Modifier liegen um 200.000.

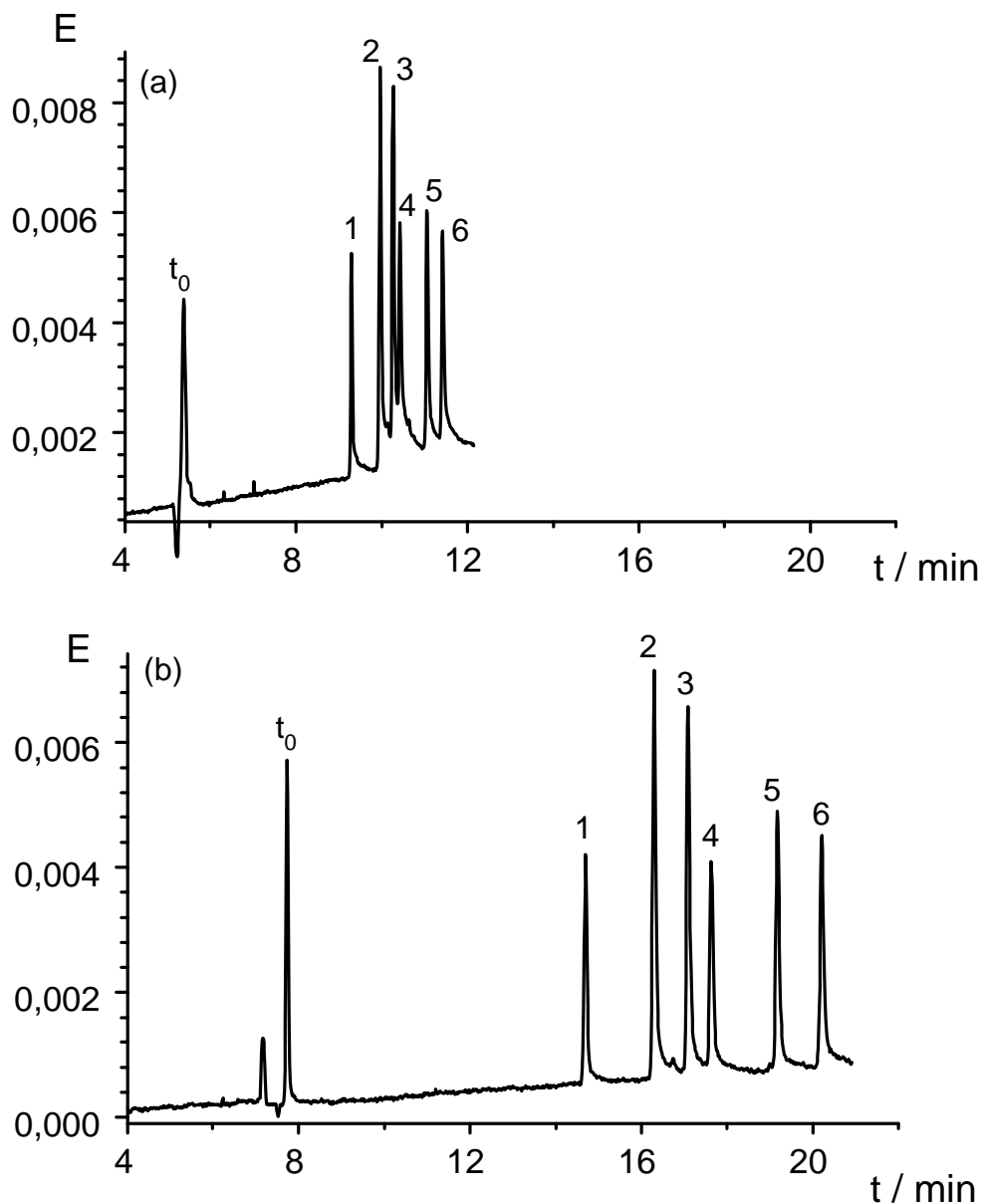


Abb.36: Trennung von Nitrotoluolen ((a) ohne Modifier; (b) $c(\text{HMB}) = 40 \text{ mmol/L}$) bei pH = 4,6

Peak-Zuordnung: siehe Abb.33

(Meßbedingungen: siehe Abb.33; Trennelektrolyt: (b) $c(\text{HMB}) = 40 \text{ mmol/L}$)

Ebenso wie bereits für OTAB und TBAB beobachtet, werden durch Zugabe von HMB zum Trennelektrolyten bei aciden Analyten die Pseudo-Retentionsfaktoren k^* erheblich verringert. In Abb.37 ist beispielhaft die Beeinflussung der Trennung acider und neutraler Vanille-Bestandteile durch Zugabe von HMB dargestellt. Die Trennung wurde bei pH 9,0 und 40 mmol/L TTAB ohne und mit 40 mmol/L HMB durchgeführt. Wie bei Zugabe von TBAB und OTAB wird die Retention der partiell negativ geladenen Analyte (Vanillinsäure, 3,4-Dihydroxybenzoesäure, 4-Hydroxybenzaldehyd und Vanillin) erniedrigt, was zu einer Änderung der Elutionsreihenfolge führt. Analog zur Zugabe von TBAB bzw. OTAB lässt sich der beschriebene Effekt bei den phenolischen Verbindungen durch eine Erniedrigung des pH-Wertes unterdrücken.

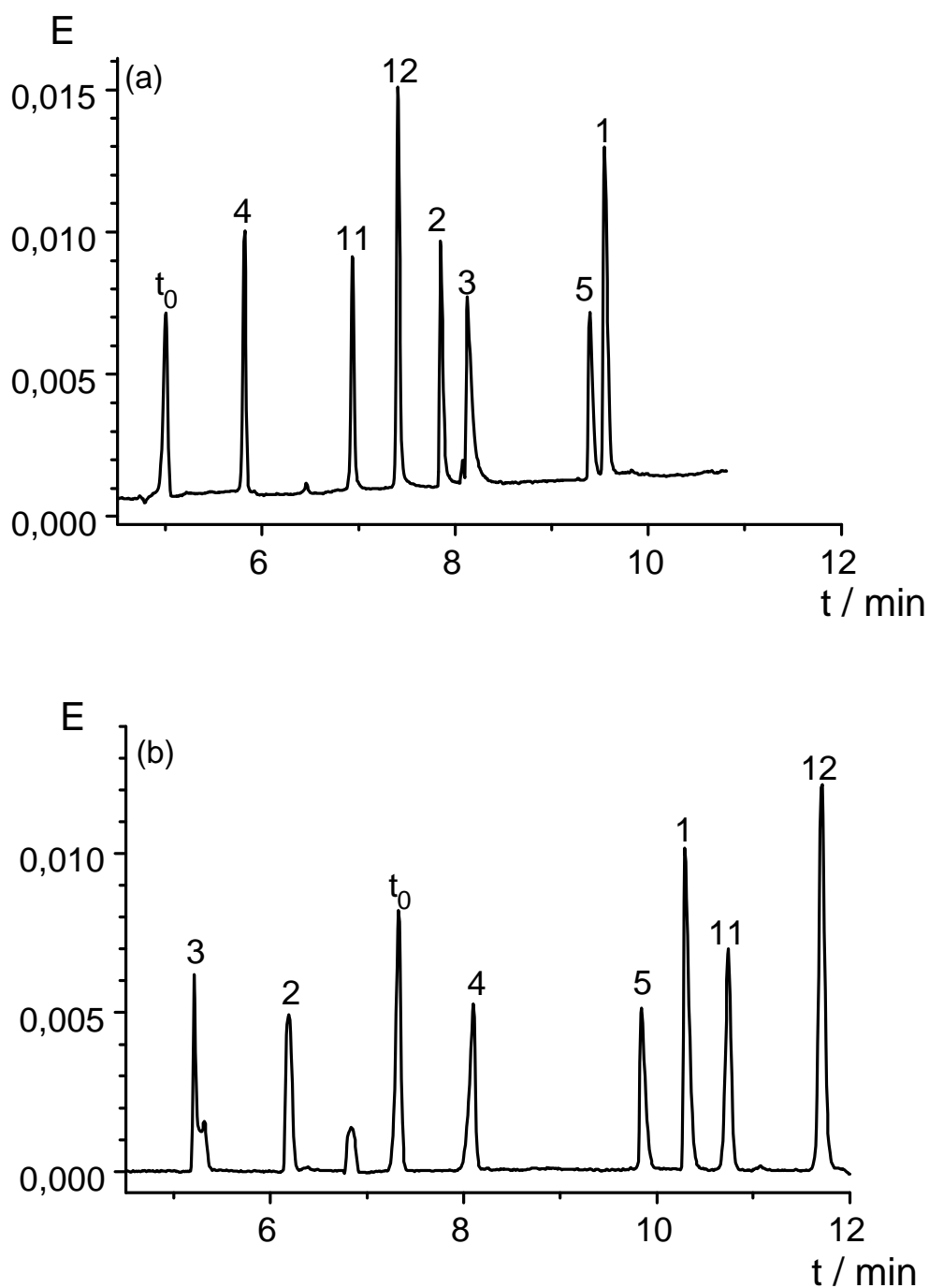


Abb.37: Trennung von neutralen und aciden Analyten ((a) ohne Modifier; (b) $c(\text{HMB}) = 40 \text{ mmol/L}$) bei $\text{pH} = 4,6$

Peakzuordnung: siehe Abb.34

(Meßbedingungen: siehe Abb.33; Trennelektrolyt $c(\text{H}_3\text{BO}_3) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7) = 10 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} 9,0$; (a) $c(\text{HMB}) = 0 \text{ mmol/L}$; (b) $c(\text{HMB}) = 40 \text{ mmol/L}$)

7.4 Einsatz von Metallsalzen

Einige kapillarelektrophoretische Verfahren verwenden Metall-Salze zur Verbesserung der Auflösung benachbarter Signale. Bei diesen Verfahren wird die elektroosmotische Mobilität μ_{eo} verringert, die Selektivität bleibt aber erhalten. PIETRYZK et al. [42] empfehlen Magnesium-, Zink- oder Cadmiumsalze zur Kontrolle des EOF. BRECHTEL et al. [43] schlagen Bariumsalze zur Unterdrückung des EOF bei hohen pH-Werten vor. Messungen des Strömungs-Potentials von Quarz zeigen, daß anorganische Gegenionen das elektrokinetische Potential ζ verändern [44]. Mehrwertige anorganische Gegenionen sind in der Lage, das Vorzeichen des elektrokinetischen Potentials umzukehren. Die vorgenannten Ergebnisse zeigen, daß Metallsalze in der Lage sind, mit den kationischen Tensid-Monomeren um die Ionenaustausch-Positionen an den negativ geladenen dissoziierten Silanol-Gruppen zu konkurrieren.

Wir untersuchten die Auswirkung auf μ_{eo} durch Zugabe ein- und zweiwertiger anorganischer Metallsalze zum Trennelektrolyten. Im Gegensatz zum Einsatz quartärer Ammoniumverbindungen als Modifier ist eine Beeinflussung der Mizellenstruktur und damit der elektrophoretischen Mobilität der Mizellen μ_{MC} nicht zu erwarten. Bei einer Reduktion der elektroosmotischen Mobilität μ_{eo} und gleichbleibender elektrophoretischer Mobilität μ_{MC} , sollte eine Aufweitung des Retentionsfensters resultieren. CsCl, KCl, CaCl₂ und BaCl₂ wurden als Modifier ausgewählt. Durch diese Auswahl wurden die Größen Ionenladung und Ionenradius erfaßt.

Die Messungen wurden mit einem Trennelektrolyten, der 40 mmol/L TTAB und unterschiedliche Konzentration des jeweiligen Metallsalzes enthielt, bei pH 4,6 und pH 9,0 durchgeführt. Nachteilig beim Einsatz von Metallsalzen als Modifier ist die Zunahme der elektrischen Stromstärke, so steigt die Stromstärke bei Zugabe von 30 mmol/L CaCl₂ zu einem 40 mmol/L TTAB enthaltenen Trennelektrolyten, bei einer vorgegebenen Spannung von 25 kV von 59 μ A auf 200 μ A (Kapillare: 75 μ m I.D., 50 cm effektive Länge, 57 cm Gesamtlänge) an. Die Messungen wurden daher bei einer Spannungsvorgabe von 15 kV durchgeführt, um Probleme durch JOULsche Wärme zu vermeiden.

Die durchgeführten Messungen konnten die Annahme, daß mit zunehmender Metallsalzkonzentration eine Abnahme der elektroosmotischen Mobilität μ_{eo} zu beobachten ist, bestätigen. Dieser Effekt ist bei zweiwertigen Metallkationen größer als bei einwertigen, dagegen hat der Ionenradius bei gleicher Ionenladung keinen zusätzlichen signifikanten Einfluß auf den EOF. Die elektrophoretische Mobilität der Mizellen μ_{MC} bleibt, wie zu erwarten, bei Zugabe eines Metallsalzes zum Trennelektrolyten unbeeinflusst, woraus eine deutliche Aufweitung des Retentionsfenster resultiert. Die elektroosmotische Mobilität μ_{eo} , die elektrophoretische Mobilität der Mizellen μ_{MC} und der Quotient t_{MC}/t_0 sind in Tab.20 für CaCl₂ und KCl vergleichend gegenübergestellt. Zur Überprüfung der erhaltenen Meßergebnisse, wurden die Messungen mit Calciumchlorid als Modifier bei einem pH-Wert des Trennelektrolyten von 4,6 mit einer neuen Kapillare wiederholt. Die erhaltenen Daten konnten die ersten Ergebnisse vorbehaltlos bestätigen. Die Daten sind in Tab.20 in Klammern mitangegeben.

Bei pH 9,0 steigt der Quotient t_{MC}/t_0 bei einer Zugabe von 30 mmol/L CaCl₂ bzw. BaCl₂ von 2,4 auf 3,2 an und bei pH 4,6 von 2,5 auf 4,6. Die durch Zugabe von CaCl₂ erzielten Verbesserungen hinsichtlich t_{MC}/t_0 , entsprechen denen, die bei Zusatz von quartären Ammoniumverbindungen erzielt werden.

Die Annahme, daß die Erhöhung des Quotient t_{MC}/t_0 auf eine Zunahme der Ionenstärke des Trennelektrolyten zurückzuführen sei, wurde durch Variation der Pufferkonzentrationen geprüft. Die Konzentration im Trennelektrolyten (pH 9) wurde dabei auf 25 mmol/L je Pufferkomponente erhöht. Die Verbesserung des Quotienten t_{MC}/t_0 ist deutlich geringer als bei der Zugabe von Metallsalzen, so wurde nur eine Erhöhung von 2,1 auf 2,3 erzielt.

7 Einsatz von Modifiern bei Verwendung eines kationischen Tensids

Tab.20: Elektroosmotische Mobilität μ_{eo} , elektrophoretische Mobilität der Mizellen μ_{MC} , sowie der Quotient t_{MC}/t_0 in Abhängigkeit von der Zugabe ein- und zweiwertigen Metallsalzen als Modifier

(Meßbedingungen: siehe Abb.33; Trennelektrolyt: $c(\text{TTAB}) = 40 \text{ mmol/L}$; $c(\text{H}_3\text{BO}_3) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7) = 10 \text{ mmol/L}$, pH 9,0; $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(\text{CH}_3\text{COONa}) = 10 \text{ mmol/L}$, pH = 4,6; $c(\text{Metallsalze}) = \text{variabel}$)

Modifier	c / (mol/L)	$\mu_{eo} / (10^{-3} \text{ cm}^2/\text{Vs})$	$\mu_{MC} / (10^{-3} \text{ cm}^2/\text{Vs})$	t_{MC}/t_0
KCl, pH 4,6	0	-0,58	0,35	2,6
	10	-0,54	0,34	2,7
	30	-0,49	0,33	3,1
	50	-0,46	0,33	3,4
KCl, pH 9,0	0	-0,64	0,35	2,2
	10	-0,59	0,35	2,4
	30	-0,54	0,34	2,7
	50	-0,52	0,34	2,9
CaCl₂, pH 4,6	0	-0,58 (-0,57)	0,35 (0,35)	2,6 (2,6)
	10	-0,49 (-0,50)	0,34 (0,34)	3,2 (3,1)
	20	-0,45 (-0,46)	0,34 (0,33)	3,8 (3,6)
	30	-0,43 (-0,43)	0,33 (0,33)	4,5 (4,3)
CaCl₂, pH 9,0	0	-0,61	0,35	2,4
	10	-0,54	0,33	2,6
	20	-0,51	0,34	2,9
	30	-0,48	0,33	3,2

Die Retentionsfaktoren neutraler Analyte werden durch Zugabe eines Metallsalzes zum Trennelektrolyten leicht reduziert (Tab.21 und 22). Diese Abnahme läßt sich mit der durch Salzzugabe erhöhten spezifischen Leitfähigkeit des Trennelektrolyten und der damit verbundenen Erhöhung der Temperatur während der Trennung erklären. Abb.38 zeigt den Einfluß der Zugabe von 30 mmol/L CaCl_2 zu einem Trennelektrolyten von pH 4,6 und einer TTAB-Konzentration von $c = 40$ mmol/L bei der Trennung von Nitrotoluolen. Aufgrund der Abnahme von μ_{eo} ist eine Zunahme der Durchflußzeit t_0 und damit der gesamten Analysendauer festzustellen. Durch Zugabe eines der ausgewählten Metallsalze ist es möglich, die Auflösung schlecht getrennter Signale deutlich zu verbessern. Die Elutionsreihenfolge neutraler Analyte bleibt auch bei Zugabe eines Metallsalzes unverändert. Die Effizienz des Trennsystems bleibt erhalten und die berechneten Trennstufenzahlen für die in Abb.38b dargestellten Signale liegen zwischen 210000 und 240000.

Während die Selektivität für neutrale Analyte durch Zugabe von Metallsalzen zum Trennelektrolyten nicht beeinflusst wird, ist bei aciden Analyten ein drastischer Effekt, ähnlich dem durch Zugabe einer quartären Ammoniumverbindung, zu beobachten. Beispielhaft ist in Abb.39 a und b die Trennung einiger Vanilleinhaltsstoffe ohne und mit Zusatz von 30 mmol/L CaCl_2 zum Trennelektrolyten bei pH 9,0 dargestellt. Die Retention der phenolischen Analyte Vanillin und 4-Hydroxybenzaldehyd sowie die der Benzoessäuren (Vanillinsäure und 3,4-Dihydroxybenzoessäure) wird durch den Zusatz des Metallsalzes stark verringert (Tab.21). Für 3,4-Dihydroxybenzoessäure ist der Effekt so drastisch, daß diese Verbindung noch vor dem Durchflußzeitmarker Thioharnstoff eluiert wird.

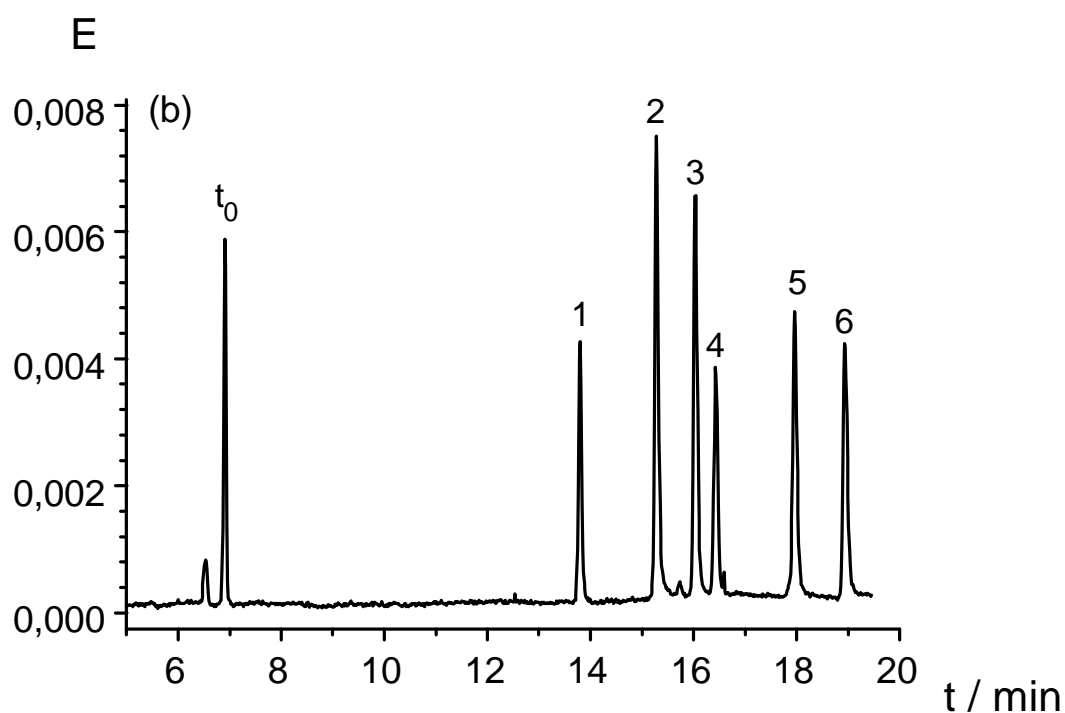
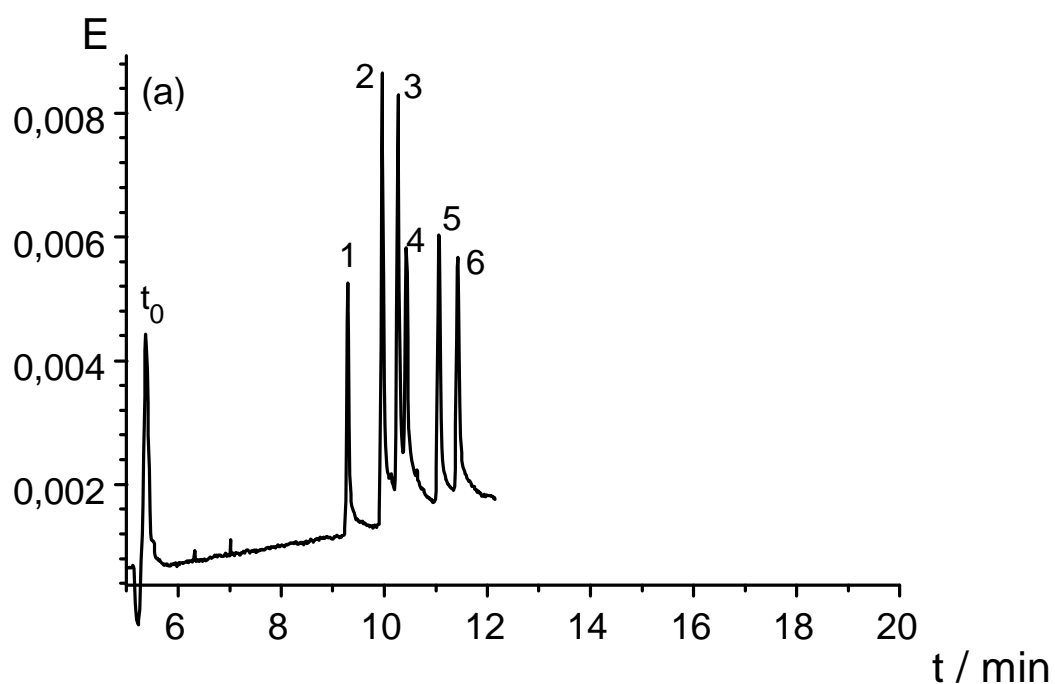


Abb.38: Trennung von Nitrotoluolen ((a) ohne Modifier; (b) $c(\text{CaCl}_2) = 30 \text{ mmol/L}$) bei $\text{pH} = 4,6$
 Peak-Zuordnung: siehe Abb.33
 (Meßbedingungen: siehe Abb.33; Trennelektrolyt: $c(\text{CaCl}_2) = 30 \text{ mmol/L}$)

7 Einsatz von Modifiern bei Verwendung eines kationischen Tensids

Bei pH 4,6 liegen die phenolischen Analyte (Vanillin und 4-Hydroxybenzaldehyd; pK_s -Wert > 8) undissoziiert vor, wodurch die Zugabe von CaCl_2 als Modifier zum Trennelektrolyten keinen Einfluß auf ihre Retention hat (Tab.22). Bei diesem pH-Wert wird nur die Retention der Benzoesäuren (3,4-Dihydroxybenzoesäure und Vanillinsäure; pK_s -Wert < 5) beeinflusst.

Offensichtlich beeinflusst die Zugabe eines Metallsalzes einzig die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen Analyten und den positiv geladenen Mizellen. Die Verteilungskonstante der Analyte zwischen mizellarer und wäßriger Phase wird dabei in Richtung wäßriger Phase verschoben. Dieser Effekt kann, wenn auch in schwächerer Form, durch Erhöhung der Ionenstärke des Trennelektrolyten erzeugt werden (Abb.39c).

Der Effekt der Unterdrückung der Wechselwirkungen zwischen positiv geladenen Mizellen und negativ geladenen deprotonierten Analyten nach Zugabe von ionischen Modifiern, läßt sich durch einem Vergleich mit einem Anionenaustauscher erklären. Durch die Zugabe des ionischen Modifiers wird die Anionenkonzentration des Trennelektrolyten deutlich erhöht und damit das betreffende Austausch-Gleichgewicht verschoben.

Tab.21: Pseudo-Retentionsfaktor k^* für ausgewählte Analyte bei Zugabe von CaCl_2 als Modifier für pH = 9,0

(Meßbedingungen: siehe Abb.33; Trennelektrolyt: $c(\text{TTAB}) = 40 \text{ mmol/L}$; $c(\text{H}_3\text{BO}_3) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7) = 10 \text{ mmol/L}$, pH = 9,0)

$c_{\text{CaCl}_2} / (\text{mmol/L})$	0	10	20	30
Analyt				
Piperonal	1,00	1,05	0,98	0,99
Cumarin	1,40	1,48	1,36	1,38
4-Hydroxybenzaldehyd	5,23	3,58	2,34	1,88
Vanillin	5,89	4,04	2,62	2,10
Vanillinsäure	1,84	0,71	0,29	0,13
3,4-Dihydroxybenzoesäure	2,18	0,57	0,07	-0,05

7 Einsatz von Modifiern bei Verwendung eines kationischen Tensids

Tab.22: Pseudo-Retentionsfaktor k^* für ausgewählte Analyte bei Zugabe von CaCl_2 als Modifier für $\text{pH} = 4,6$

(Meßbedingungen: siehe Abb.33; Trennelektrolyt: $c(\text{TTAB}) = 40 \text{ mmol/L}$; $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(\text{CH}_3\text{COONa}) = 10 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 4,6$)

$c_{\text{CaCl}_2} / (\text{mmol/L})$	0	10	20	30
Analyt				
Piperonal	0,99	0,97	0,96	0,95
Cumarin	1,38	1,35	1,34	1,32
4-Hydroxybenzaldehyd	1,61	1,69	1,70	1,69
Vanillin	1,38	1,35	1,34	1,34
Vanillinsäure	1,66	0,97	0,59	0,59
3,4-Dihydroxybenzoesäure	1,66	1,06	0,74	0,66

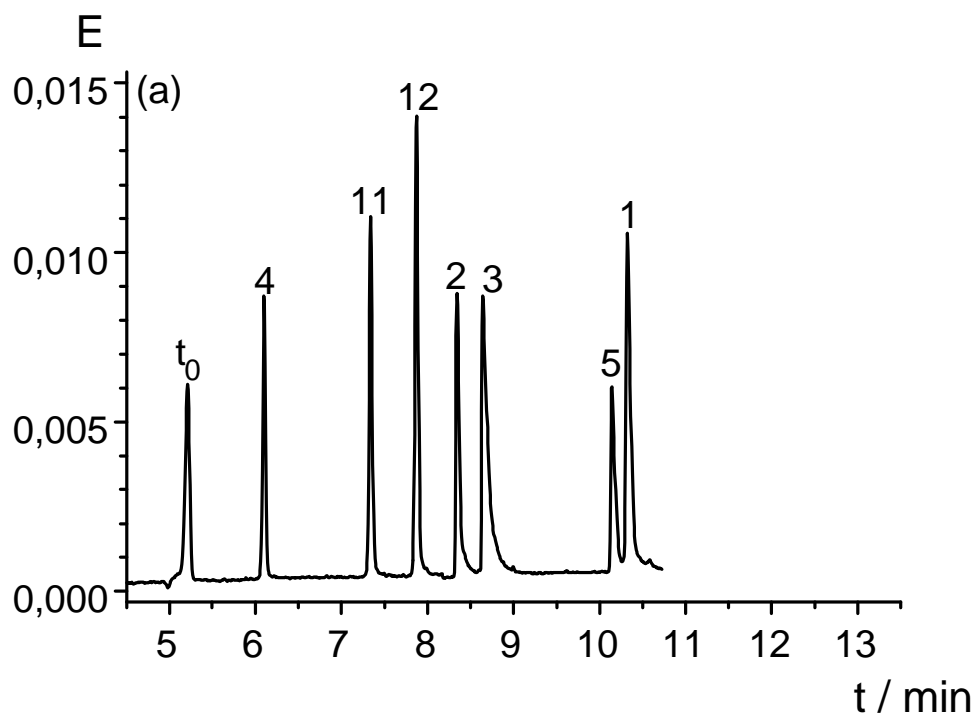


Abb.39: Fortsetzung siehe nächste Seite

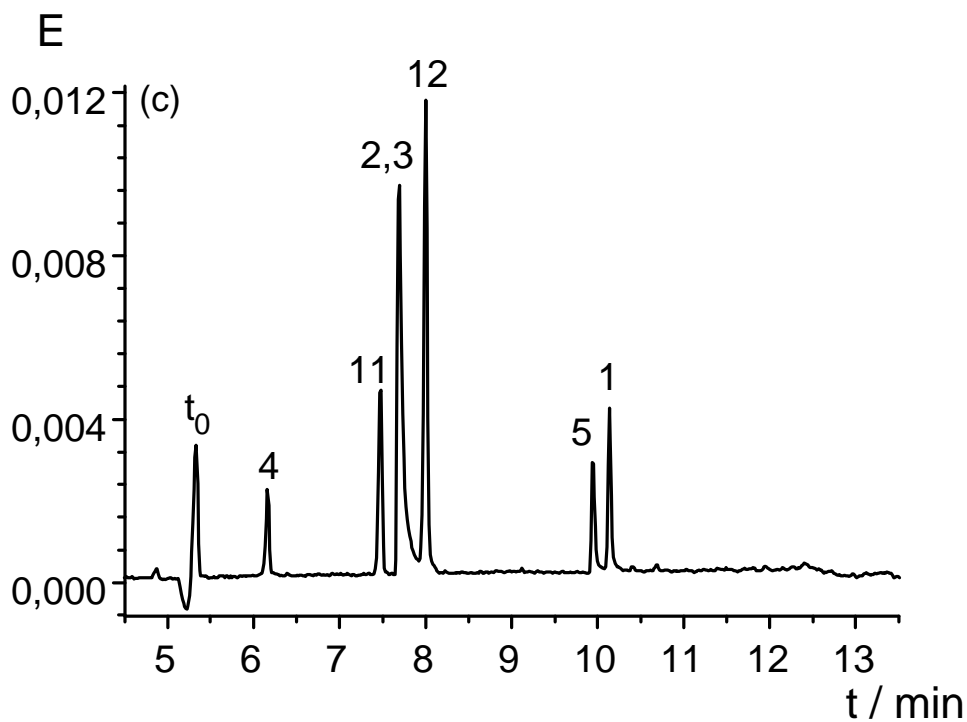
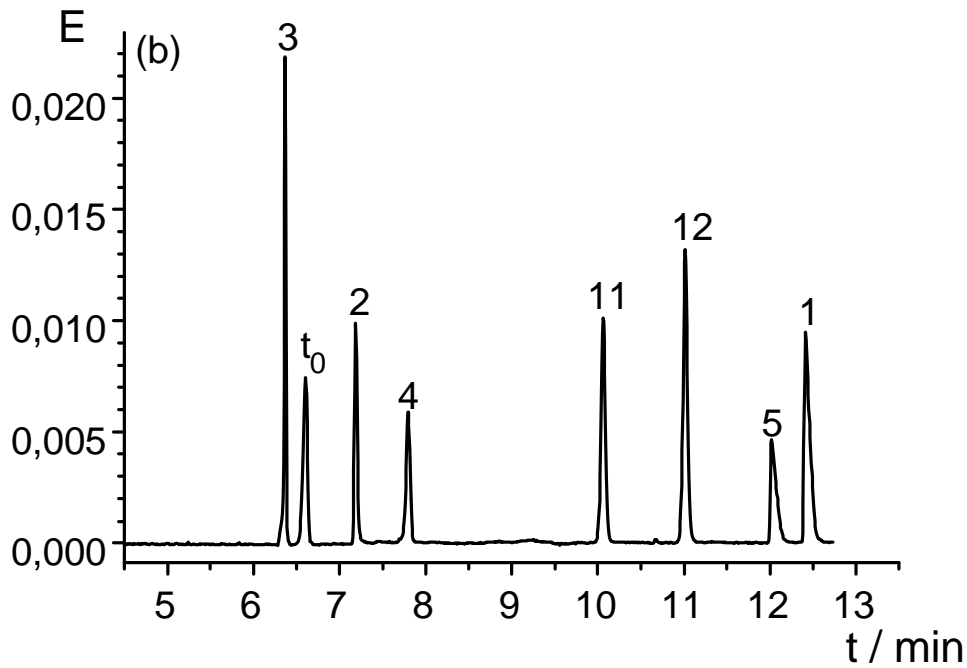


Abb.39: Trennung von neutralen und aciden Analyten ((a) ohne Modifier; (b) $c(\text{CaCl}_2) = 30 \text{ mmol/L}$; (c) $c(\text{Puffer}) = 25 \text{ mmol/L}$ bei $\text{pH} = 9,0$)

Peak-Zuordnung: siehe Abb.34

(Meßbedingungen: siehe Abb.33; Trennelektrolyt: $c(\text{H}_3\text{BO}_3) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7) = 10 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 9,0$; (a) $c(\text{CaCl}_2) = 0 \text{ mmol/L}$; (b) $c(\text{CaCl}_2) = 30 \text{ mmol/L}$; (c) $c(\text{H}_3\text{BO}_3) = 25 \text{ mmol/L}$, $c(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7) = 25 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 9,0$)

7.5 Einsatz von Hydroxypropylmethylcellulose

Die chemische Modifikation der Kapillar-Oberfläche mit Substanzen wie Trimethylchlorsilan sollte einen drastischen Einfluß auf den EOF und damit das Retentionsfenster haben. MUIJSELAAR et al. [25] diskutieren eine Aufweitung des Retentionsfenster in der MEKC mit anionischem Tensid durch Einsatz von Polyethylenglycol. Sie berichten von einer Abnahme der elektroosmotischen Mobilität μ_{eo} , aber auch von einer Abnahme der Effizienz der Trennung aufgrund von Wechselwirkungen zwischen Analyt und sorbierter Schicht. Ihrer Meinung nach ist die Möglichkeit des Einsatzes von Kapillaren mit chemisch behandelten Oberflächen in der MEKC gering.

Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) wird als Modifier zur Reduktion oder nahezu vollständigen Unterdrückung des EOF in Quarzglas-Kapillaren genutzt [45]. In unseren Untersuchungen sollte der Zusatz von HPMC zum Trennelektrolyten zur Reduktion des EOF eingesetzt werden. Unter der Annahme, daß die Mobilität der Mizellen μ_{MC} durch die Behandlung der Oberfläche der Kapillare nicht beeinflusst wird, sollte damit eine Aufweitung des Retentionsfenters möglich sein.

Vorversuche zeigten, daß für eine ausreichende Wiederholpräzision zwischen den Messungen mit NaOH (0,1 mol/L) gespült werden muß. Anschließend wird die Kapillare wieder für 1,5 min mit einem HPMC enthaltenden Trennelektrolyten für die nächste Messung vorbereitet. Bei der eigentlichen Messung durfte der Trennelektrolyt kein HPMC enthalten, da sonst die resultierende hohe Viskosität zu einer drastischen Erhöhung der Retentionszeiten verbunden mit einer starken Bandenverbreiterung führt. HPMC wird damit nur zur Vorkonditionierung der Kapillare eingesetzt. Zur Vorkonditionierung der Kapillare werden dem Trennelektrolyten (pH 9,0; 80 mmol/L TTAB) 0,0001 % (m/v) HPMC zugesetzt. Weitere Messungen haben gezeigt, daß nach vierminütigem Spülen der Kapillare mit HCl (1 mol/L) die Cellulose wieder vollständig aus der Kapillare entfernt werden kann.

Wie erwartet wird die elektroosmotische Mobilität μ_{eo} durch das Vorkonditionieren der Kapillare mit HPMC drastisch verringert. Da zugleich μ_{MC} nicht beeinflusst wird, resultiert eine Verbesserung des Quotienten t_{MC}/t_0 von 2,2 auf 3,5 (Tab.23).

7 Einsatz von Modifiern bei Verwendung eines kationischen Tensids

Tab.23: Elektroosmotische Mobilität μ_{eo} , elektrophoretische Mobilität der Mizellen μ_{MC} , sowie der Quotient t_{MC}/t_0 in Abhängigkeit von der Vorkonditionierung der Kapillare HPMC
(Meßbedingungen: siehe Abb.33; Trennelektrolyt: $c(\text{TTAB}) = 80 \text{ mmol/L}$; $c(\text{H}_3\text{BO}_3) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7) = 10 \text{ mmol/L}$; pH 9,0)

	$\mu_{eo} / (10^{-3} \text{ cm}^2/\text{Vs})$	$\mu_{MC} / (10^{-3} \text{ cm}^2/\text{Vs})$	t_{MC}/t_0
Ohne Vorkonditionierung	-0,63	0,35	2,2
Vorkonditionierung mit 0,0001 % (m/v) HPMC	-0,49	0,35	3,5

Abb.40 zeigt die Trennung einer Auswahl von Vanilleinhaltsstoffen ohne und mit Vorkonditionierung der Kapillare mit HPMC. Die Retentionsfaktoren der neutralen und der aciden Analyte werden durch die Vorkonditionierung nicht beeinflusst, somit bleibt die Selektivität unverändert. Für schlecht aufgetrennte Signale wird nach der Vorkonditionierung jedoch keine bessere Trennung beobachtet, denn ein erheblicher Nachteil des Prozesses der Vorkonditionierung ist der deutliche Verlust an Effizienz bei der nachfolgenden Trennung. Die Bodenzahlen der Trennung liegen ohne Vorkonditionierung zwischen 150.000 und 330.000, nach der Vorkonditionierung nur noch bei 40.000 bis 80.000 (Abb.40b). Der Gewinn durch die Aufweitung des Retentionsfensters wird durch den Verlust an Effizienz völlig kompensiert.

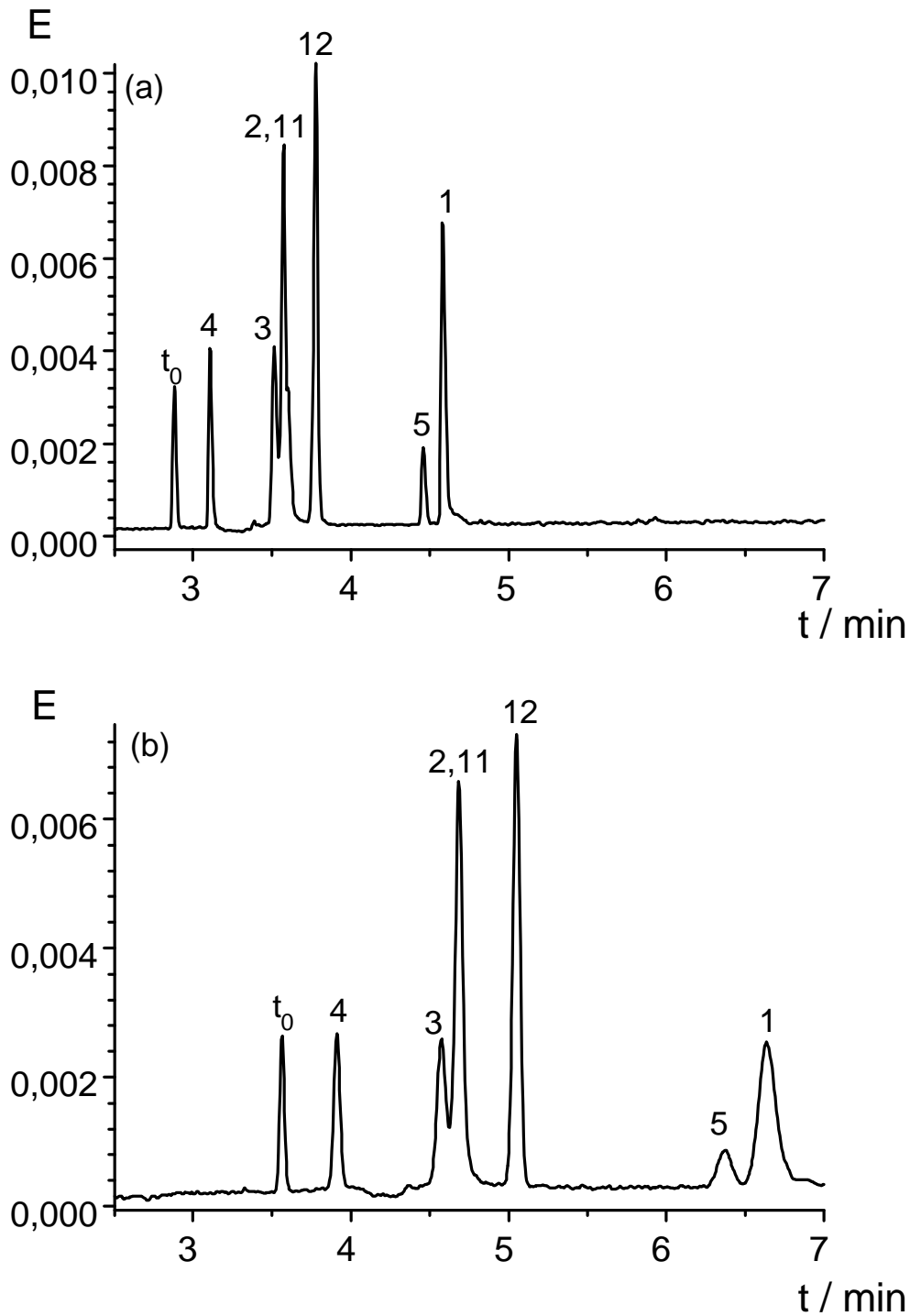


Abb.40: Trennung von neutralen und aciden Analyten ((a) ohne Vorkonditionierung (b) Vorkonditionierung mit = 0,0001 % (v/v) HPMC)

Peak-Zuordnung: siehe Abb.34

(Meßbedingungen: siehe Abb.33; Trennelektrolyt: $c(\text{TTAB}) = 80 \text{ mmol/L}$; $c(\text{H}_3\text{BO}_3) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7) = 10 \text{ mmol/L}$; $\text{pH} = 9,0$)

7.6 Übersicht über die eingesetzten Modifier

Nicht alle getesteten Modifier waren in der Lage, zu einer Aufweitung des Retentionsfensters und damit zu einer Verbesserung der Trennung beizutragen. Die Verwendung von organischen Modifiern wie Acetonitril oder Harnstoff (wie bei Natriumdodecylsulfat als Mizellenbildner üblich) war nicht von Erfolg gekrönt.

Der Ansatzpunkt zur Aufweitung des Retentionsfensters beim Einsatz von kationischen Tensiden ist die Konkurrenz des Modifiers mit den Tensidmonomeren um die negativ geladenen dissoziierten Silanolgruppen an der Kapillaroberfläche und damit die Veränderung der adsorbierten Tensid-Doppelschicht. Octyltrimethylammoniumbromid (OTAB), Tetrabutylammoniumbromid (TBAB) und Hexamethoniumbromid (HMB), sowie zweiwertige Metallsalze erwiesen sich als geeignete Modifier für die MEKC bei Verwendung kationischer Tenside. Die besten Resultate wurden beim Zusatz von OTAB erhalten. Nachteilig beim Einsatz ionischer Modifier ist die erhöhte elektrische Leitfähigkeit, die eine Limitierung der maximal vorgebbaren Trennspannung erfordert.

Die ionischen Modifier haben einen deutlichen Einfluß auf die Wechselwirkung der negativ geladener Analyte mit den positiv geladenen Mizellen und damit auf deren Retention. Dieser Effekt ist erwartungsgemäß für acide Analyte pH-abhängig, da er für Analyten mit $pK_s \gg pH$ des Trennelektrolyten vollständig unterdrückt werden kann. Dieser Einfluß auf negativ geladene Analyte führt zu einer Änderung der Selektivität. Diese Selektivitätsänderung kann gezielt zur Optimierung von Trennungen genutzt werden.

8 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie

Die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (High performance liquid chromatography, HPLC) ist eine der weitverbreitetsten Trenntechniken in Routinelaboratorien. Unter Chromatographie wird ein Trennprozeß verstanden, bei dem ein Analytgemisch aufgetrennt wird aufgrund unterschiedlicher Verteilungskonstanten der Analyte zwischen einer stationären und einer mobilen Phase.

In der Normalphasen-Chromatographie erfolgt die Trennung durch Adsorption der Analyte an einer polaren stationären Phase, die aus einem Material mit sehr großer spezifischer Oberfläche besteht. Die Materialien, die als stationäre Phase verwendet werden, sind meistens Silicagel (Kieselgel), aber auch Aluminiumoxid oder Magnesiumoxid. Die mobile Phase ist dagegen relativ apolar (Pentan bis Tetrahydrofuran). Aufgrund der hohen Polarität der stationären Phase eluiert ein apolares Lösungsmittel schwächer als ein stärker polares. Polare Analyte werden später eluiert als unpolare.

Gegensätzlich dazu ist die Umkehrphasen-Chromatographie. Bei dieser Technik wurde die Oberfläche der stationären Phase durch Umsetzung der Silanol-Gruppen des Kieselgels z.B. mit Alkyl- oder Alkylarylchlorsilanen unpolar gemacht. Die in der Umkehrphasen-Chromatographie verwendeten stationären Phasen werden nach dem immobilisierten organischen Rest klassifiziert. Die stationäre Phase ist sehr apolar und als mobile Phase werden daher relativ polare Lösungsmittel (Wasser bis Dioxan) verwendet. Ein polares Lösungsmittel eluiert bei diesem Elutionsmodus schwächer als ein weniger polares. Polare Analyte werden früher eluiert als unpolare.

8.1 Kenngrößen der Chromatographie

Aus einem Chromatogramm lassen sich sowohl qualitative als auch quantitative Aussagen ableiten. Die Retentionszeit einer Substanz in einer Mischung entspricht bei sonst gleichen chromatographischen Bedingungen der Retentionszeit bei Injektion der Reinsubstanz. Somit liefert die Retentionszeit eine qualitative Information.

Unter chromatographischen Bedingungen wird die Art der Trennsäule, die Zusammensetzung und Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase sowie die Temperatur der Trennsäule verstanden. Für quantitative Aussagen ist wichtig, daß bei konstanter Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase die Fläche eines Peaks proportional zur Stoffmenge der injizierten Probe ist.

Da die Retentionszeit von der Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase und der Trennsäule abhängig ist, ist die Retentionszeit zur Charakterisierung einer Substanz ungeeignet. Besser geeignet ist der Retentionsfaktor k (Gl.6), der von der Säulenlänge und der Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase unabhängig ist.

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (6)$$

t_0 = Durchflußzeit (ermittelt mit einer nichtretardierte Substanz)

t_r = Retentionszeit eines Analyten

8.2 Die verwendete HPLC-Apparatur

Eine HPLC-Apparatur ist grundsätzlich aus den Elementen Pumpe, Trennsäule mit Vorsäule und Detektoreinheit aufgebaut. Zusätzlich kann zum Entgasen der mobilen Phase nach den Lösungsmittel-Vorratsflaschen ein Degaser geschaltet werden. Die Probenaufgabe kann manuell über ein Injektionsventil oder automatisch über einen Autosampler erfolgen. Die Verbindung der einzelnen Bauelemente erfolgt über Edelstahl oder PEEK-Kapillaren. Zur besseren Wiederholpräzision kann die Trennsäule in einem Säulenofen temperiert werden.

Die von uns verwendete HPLC-Apparatur (Abb.41) besteht aus einem Degaser, einer Hochdruck-Gradientenpumpe, einem Autosampler, der Trennsäule mit Vorsäule und der Detektoreinheit mit Dioden-Array- und Fluoreszenzdetektor.

Zur Entgasung der eingesetzten Eluenten wurde ein Membran-Degaser verwendet. Vor allem der Fluoreszenzlöschung verursachenden Sauerstoff sollte auf diese Weise entfernen werden. Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Degaser können drei Eluentenströme gleichzeitig entgast werden.

Die Hochdruck-Gradientenpumpe besteht aus zwei separaten Pumpeneinheiten, wobei die Mischung der Eluenten hinter den Pumpenköpfen erfolgt. Aufgrund dieser Anordnung wird ein pulsationsarmes Pumpen ermöglicht. An die Pumpe können vier Eluenten angeschlossen werden, wobei der Eluentenstrom immer nur aus zwei Eluenten gemischt werden kann. Im vorliegenden Fall wurde mit einem binären Gradienten aus Methanol und wäßriger Pufferlösung verschiedener pH-Werte gearbeitet. Die verwendete Flußrate betrug 0,5 mL/min.

Die Probenaufgabe erfolgte automatisch über einen Autosampler, der 66 kleine Positionen für 700 µL-Vials und 3 größere Positionen für 2,5 mL-Vials besitzt. Der Autosampler wurde als externes Gerät betrieben und daher von Hand programmiert. Über die Programmierung wird das Injektionsvolumen, die Anzahl an wiederholten Injektionen je Probe und die Zeitdauer zwischen zwei Injektionen geregelt. Das bei der überwiegenden Zahl an Messungen aufgegebene Injektionsvolumen betrug 5 µL. Bei der Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurde ein Injektionsvolumen von 10 µL gewählt.

Die Trennungen wurden auf einer Umkehrphase (RP) Lichrospher® 100 C-18-Säule der Korngröße 5 µm realisiert. Wir arbeiteten mit Säulen unterschiedlicher Länge. Eine kurze 125 mm Säule zur Bestimmung der Derivatisierungsausbeuten von Einzelsubstanzen und einer langen 250 mm Säule zur Trennung von Analytgemischen. Der Säuleninnendurchmesser wurde mit 3 mm relativ eng gewählt, damit ein geringerer Verbrauch an mobiler Phase möglich wird. Die verwendeten Edelstahl- und PEEK-Kapillaren wurden mit einem Innendurchmesser von 0,17 mm dem Volumen der Trennsäule angepaßt. Die Vorsäulen der Länge 10 mm und dem Innendurchmesser 3 mm waren gleichfalls mit dem RP-C18-Material der Korngröße 5 µm gefüllt. Vorsäule und Trennsäule sind in einem Kartuschen-System miteinander verbunden.

Nach der Trennsäule ist zuerst ein Dioden-Array-Detektor geschaltet und daran anschließend ein Fluoreszenzdetektor. Diese Anordnung wurde gewählt, da die Detektionszelle beim Dioden-Array-Detektor deutlich kleiner ist und damit die aus dem Totvolumen der Detektorzelle resultierende Bandenverbreiterung geringer ausfällt. Der Dioden-Array-Detektor erlaubte, während der Messung zu jeder Zeit das Absorptions-Spektrum von 190 - 360 nm in 1 nm-Schritten aufzunehmen.

Die Anregungs- und Emissionswellenlänge des Fluoreszenzdetektors konnte zwischen 220 und 750 nm ganzzahlig gewählt werden. Die Fluoreszenzanregung erfolgte bei unseren Messungen bei 266 nm und die Aufzeichnung der Emission bei 313 nm.

Die Datenaufnahme und Auswertung erfolgte mit der Software LC-Talk der Firma Thermo Quest. Während einer Messung wurden das Absorptionsspektrum von 190 - 360 nm und die Fluoreszenzemission ($\lambda = 313$ nm) aufgezeichnet. Die Software erlaubt, aus den aufgezeichneten Absorptionsspektren in 1 nm-Schritten das dazugehörige Chromatogramm darzustellen und dieses qualitativ sowie quantitativ auszuwerten.

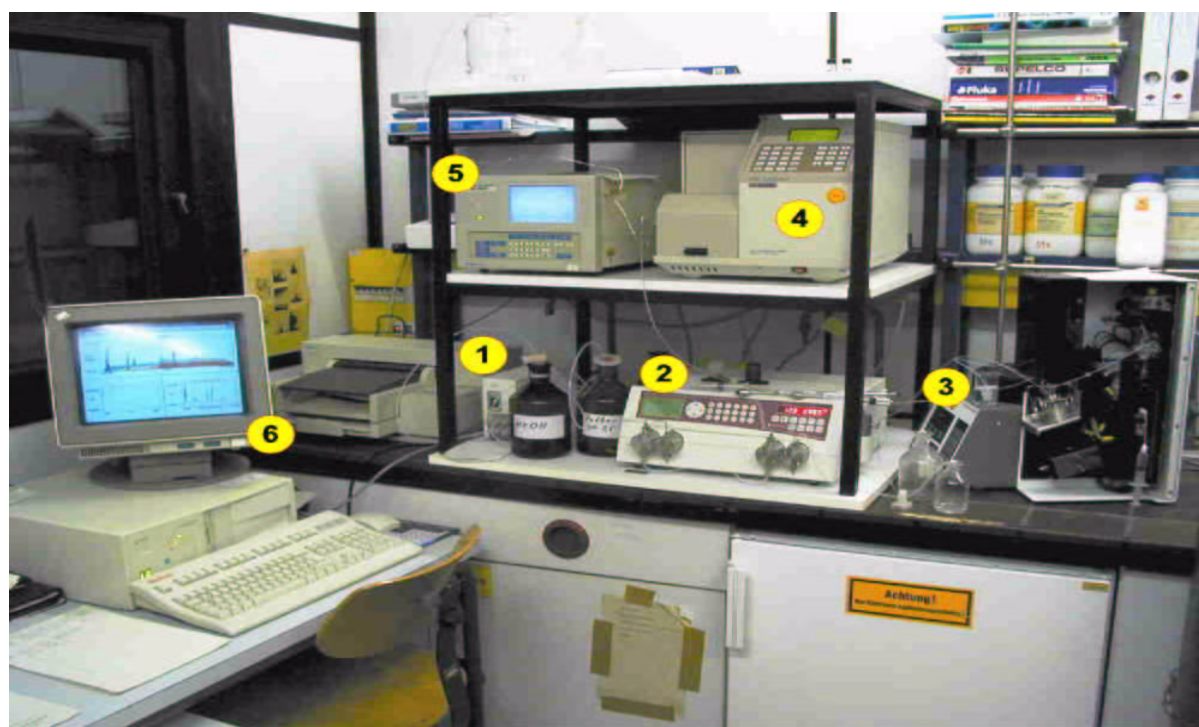


Abb.41: Photo der verwendeten HPLC-Apparatur

(Zuordnung: 1 = Degaser, 2 = HPLC-Pumpe, 3 = Autosampler, 4 = Dioden-Array-Detektor, 5 = Fluoreszenzdetektor, 6 = PC zur Datenaufnahme)

9 Polare Aminoaromaten

9.1 Vorarbeiten

Aromatische Amine sind anthropogenen Ursprungs und bedeutende industrielle Zwischen- und Endprodukte, z.B. bei der Herstellung von Farbstoffen, Pharmazeutika, Kunststoffen und Pflanzenschutzmitteln [46]. Bedeutende Eintragswege in die Umwelt sind der mikrobielle Abbau von Pflanzenbehandlungs- und Schädlingsbekämpfungsmitteln sowie von Sprengstoffaltlasten. Die jährliche Emission von aromatischen Aminen in die Umwelt wird auf 10000 t geschätzt [47]. Zahlreiche aromatische Amine besitzen ein hohes gentoxisches und kanzerogenes Potential [48].

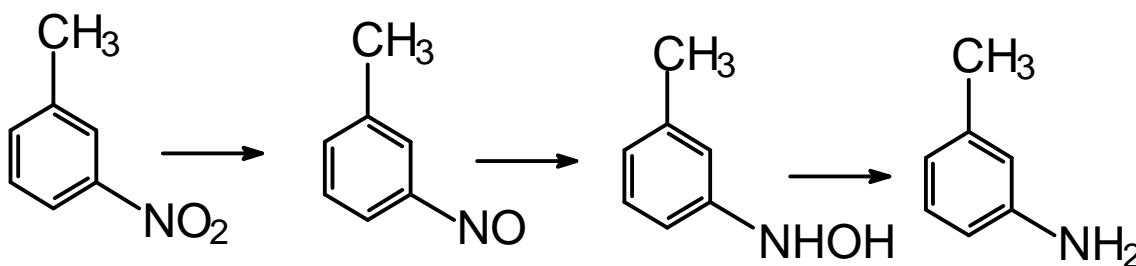
Für Trinkwasser wurde vom Bundesgesundheitsamt bereits 1980 zur Überwachung des auf dem Gelände der Rüstungsalblast in Stadtallendorf/Hessen geförderten Trinkwassers ein Grenzwert von 0,1 µg/L für die Summe der diazotierbaren aromatischen Amine festgelegt [49]. Bei der Ermittlung des Summenparameters werden die Amine mit Natriumnitrit in salzsaurer Lösung diazotiert und mit N-1-Naphthylethylendiamin (NEDA) zu Azofarbstoffen umgesetzt. Die Produkte werden bei 545 nm photometrisch vermessen und gegen 4-Nitroanilin als Bezugssubstanz verglichen. Das Verfahren wurde Mitte der siebziger Jahre von Prof. E. Pfeil in Marburg und Prof. H. Althaus vom Hygiene-Institut Gelsenkirchen zur Routineüberwachung des Trinkwassers aus Stadtallendorf/Hessen entwickelt.

Bereits 1974 wurde von Pfeil [50] die Anwesenheit aromatischer Amine in einem Abschöpfbrunnen in der Nähe einer Sprengstoffaltlast nachgewiesen. In der Folgezeit gelang es, einen Teil dieser diazotierbaren aromatischen Amine zu identifizieren [51-53]. Jedoch ergab eine Studie im Auftrag des Marburger Hygiene Instituts 1990, daß „...der Summenparameter aromatischer Amine aus prinzipiellen Gründen keine quantitativ verwertbaren Aussagen liefern kann...“ (Stellungnahme des Bundesgesundheitsamts).

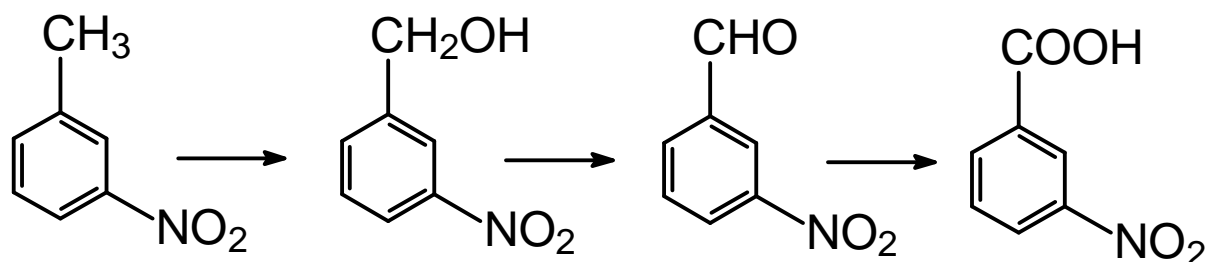
Die Analysenergebnisse, die nach der Methode des Summenparameters erhalten werden, können toxikologisch nicht bewertet werden, solange die Einzelsubstanzen, die in den Summenparameter eingehen, nicht bekannt sind. Als problematisch ist ebenfalls die Tatsache anzusehen, daß nicht alle Amine unter den gewählten Bedingungen eine Azo-Kupplung eingehen und sich die Absorptionskoeffizienten und Absorptionsmaxima der bekannten Amine unterscheiden. Bei Realproben tritt zusätzlich das Problem auf, daß ebenfalls kuppelnde Matrixbestandteile und farbige Probenbestandteile das Ergebnis verfälschen.

Zur Analyse von unpolaren und weniger polaren Komponenten, wie z.B. Nitro- und Aminonitroverbindungen, ist die gaschromatographische Trennung mit anschließender massenspektrometrischer Detektion (GC/MS) die Methode der Wahl. Sie vereint die hohe Trennleistung der Gaschromatographie mit den Vorteilen der Massenspektrometrie (hohe Selektivität und Empfindlichkeit). Die Analyse mittels Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) eignet sich besonders für die thermolabilen Sprengstoffe Tetryl (2,4,6-Trinitrophenyl-methylnitramin), Hexyl (2,2',4,4',6,6'-Hexanitrodiphenylamin), RDX (Royal Demolition Explosive, 1,3,5-Trinitro-1,3,5-triazacyclohexan) und HMX (High Melting Explosive, 1,3,5,7-Tetranitro-1,3,5,7-tetraazacyclooctan) sowie die stark saure Pikrinsäure (2,4,6-Trinitrophenol).

In der Natur wird ein Großteil der sprengstofftypischen Nitroverbindungen durch Pilze, Bakterien und Mikroalgen umgewandelt bzw. abgebaut [54]. Anaerobe Bakterien greifen diese Verbindungen im allgemeinen reduzierend an, wobei die Nitrogruppen schrittweise über Nitroso- und Hydroxylamin zu Aminogruppen umgewandelt werden [55,56]:



Bei Nitrotoluolen kann die Methylgruppe, katalysiert durch Monooxygenasen, schrittweise zur Carboxylgruppe oxidiert werden [57]:



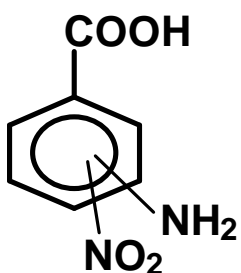
Die bei den Abbauprozessen entstehenden polareren Verbindungen stellen ein Problem in der Wasseraufbereitung dar, da davon ausgegangen werden kann, daß die bei der Trinkwasseraufbereitung verwendeten Aktivkohlefilter die polaren amphoteren aromatischen Amine nur unzureichend zurückzuhalten vermögen. Unter den amphoteren aromatischen Aminen sollen die Substanzklassen der Amino[nitro]benzoesäuren, der Amino[methyl, nitro]benzolsulfonsäuren und der Amino[methyl, nitro]phenole (Abb.42) verstanden werden. Die in der Arbeit verwendeten Abkürzungen, die teilweise von der IUPAC-Nomenklatur abweichen können, sind in Tab.24 zusammengefaßt. Eine Quantifizierung von Analyten, welche diesen Substanzklassen angehören, ist außerordentlich schwierig, weil Verfahren der Abtrennung aus wäßriger Matrix wegen der hohen Polarität dieser Verbindungen häufig unzureichend sind.

Durch Arbeiten von PETERSMANN [58] und SCHMIDT et al. [59,60] gelang es, folgende Verbindungen im Sickerwasser einer Rüstungsalzlast zu identifizieren:

2-Aminobenzoessäure, 4-Aminobenzoessäure, 2-Amino-4-nitrobenzoessäure, 2-Amino-4-nitrotoluolsulfonsäure(5), 4-Amino-2-nitrotoluolsulfonsäure(3), 2-Amino-4,6-dinitrobenzoessäure und 4-Amino-2,6-dinitrobenzoessäure.

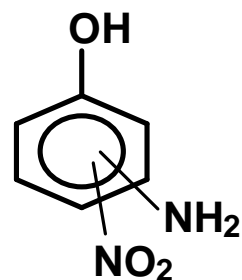
Tab.24: Die in der Arbeit für Analyte verwendeten Abkürzungen

Analyt-Name	Abkürzung
Aminobenzoessäure	ABS
Bsp.: 2-Aminobenzoessäure	2ABS
Diaminobenzoessäure	DABS
Bsp.: 3,4-Diaminobenzoessäure	3,4DABS
Aminonitrobenzoessäure	ANBS
Bsp.: 2-Amino-5-nitrobenzoessäure	2A5NBS
Aminosalicylsäure	ASS
Bsp.: 4-Aminosalicylsäure	4ASS
Aminobenzolsulfonsäure	ABSS
Bsp.: 3-Aminobenzolsulfonsäure	3ABSS
Diaminobenzolsulfonsäure	DABSS
Bsp.: 2,5-Diaminobenzolsulfonsäure	2,5DABSS
Aminonitrobenzolsulfonsäure	ANBSS
2-Amino-5-nitrobenzolsulfonsäure	2A5NBSS
Aminotoluolsulfonsäure	ATSS
Bsp.: 4-Aminotoluolsulfonsäure(2)	4ATSS2
Diaminotoluolsulfonsäure	DATSS
Bsp.: 2,6-Diaminotoluolsulfonsäure(4)	2,6DATSS4
Aminophenol	AP
Bsp.: 4-Aminophenol	4AP
Aminonitrophenol	ANP
Bsp.: 2-Amino-5-nitrophenol	2A5NP
Aminonitrobenzoessäureester	ANBSEE
Bsp.: 4-Amino-3-nitrobenzoessäureethylester	4A3NBSEE



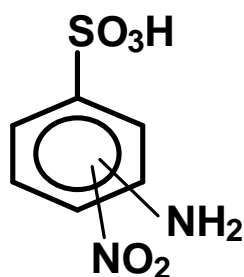
Bsp.:

2-Aminobenzoessäure
3,4-Diaminobenzoessäure
5-Amino-2-nitrobenzoessäure



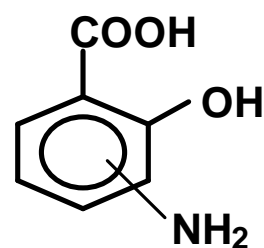
Bsp.:

2-Aminophenol
2-Amino-4-nitrophenol



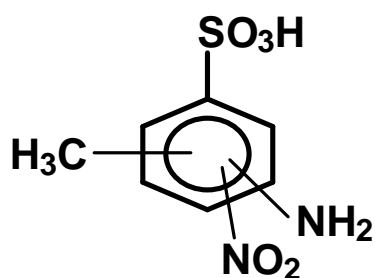
Bsp.:

2-Aminobenzolsulfonsäure
2,5-Diaminobenzoessäure
2-Amino-5-nitrobenzolsulfonsäure



Bsp.:

4-Aminosalicylsäure
5-Aminosalicylsäure



Bsp.:

2-Aminotoluol-4-sulfonsäure
2,6-Diaminotoluol-4-sulfonsäure
2-Amino-4-nitrotoluol-5-sulfonsäure

Abb.42: Untersuchte Substanzklassen von amphoteren aromatischen Aminen

9.2 Derivatisierung aromatischer Amine

Die polaren amphoteren aromatischen Transformationsprodukte, die mikrobiell oder chemisch aus den Explosivstoffen selbst und ihren Begleitkomponenten entstehen, können oft nur schwer oder nur nach vorangehender Derivatisierung angereichert und chromatographisch bestimmt werden. Zahlreiche Derivatisierungsreagenzien sind für die Vor- und auch Nachsäulen-Derivatisierung von primären und sekundären aliphatischen Aminen beschrieben [61]. Bei der Bestimmung von Aminosäuren erlangten insbesondere die Vorsäulen-Derivatisierungsreagenzien Dansylchlorid (5-(Dimethylamino)-naphthalin-1-sulfonylchlorid) und o-Phthalaldehyd (OPA)/Mercaptopropanol große Bedeutung.

1983 beschrieben EINARSSON et al. [62] die Bestimmung von Aminosäuren durch HPLC mit Fluoreszenzdetektion nach Derivatisierung mit 9-Fluorenylmethylchloroformiat (FMOC-Cl). FMOC-Cl reagiert selektiv mit primären und sekundären Aminogruppen unter Bildung von Carbaminsäureestern. Die entstehenden Produkte sind stabil [63]. Die Derivatisierungsreaktion ist bei Raumtemperatur innerhalb einer Minute abgeschlossen. Der Reagenzverbrauch durch Hydrolyse ist innerhalb dieser kurzen Zeit vernachlässigbar. Daher kann die Derivatisierung der Aminosäuren, aber auch weiterer Aminoverbindungen [64] in wässrigem Medium durchgeführt werden. Eine nachträgliche Abtrennung des überschüssigen Reagenzes durch Flüssig-flüssig-Extraktion mit Pentan oder durch Reaktion mit einem später zugesetzten hydrophoben Amin, z.B. 1-Aminoadamantan, ist jedoch unumgänglich.

Die Derivate des FMOC-Cl sind stark fluoreszierend. Das Maximum der Anregung liegt bei $\lambda = 266$ nm, das Maximum der Emission bei $\lambda = 313$ nm.

PIETSCH et al. [65] entwickelten ein Verfahren zur Bestimmung von aliphatischen Aminen und Diaminen, alicyclischen Aminen und Ethanolaminen in aufbereitetem Trinkwasser nach Derivatisierung in wässriger Phase mit FMOC-Cl und Flüssig-flüssig-Extraktion. Die gebildeten Carbaminsäureester können mittels HPLC/Fluoreszenzdetektion im trinkwasserrelevanten Konzentrationsbereich von 0,03 bis 1,0 $\mu\text{g/L}$ erfaßt werden. Dieses Verfahren zeigt, daß FMOC-Cl zur Derivatisierung polarer aromatischer Amine in umweltrelevanten Probenmatrizes geeignet sein könnte.

9.3 Entwicklung eines Derivatisierungsverfahrens

Bei der Entwicklung des Verfahrens zur Derivatisierung amphoterer aromatischer Amine mit FMOC-Cl wurde auf publizierte Verfahren zur Derivatisierung von Aminosäuren zurückgegriffen [62, 63, 66]. Die Derivatisierung der Aminosäuren wird im schwach alkalischen Milieu bei einem pH-Wert von 7,7 durchgeführt. Zur Herstellung des Puffers wird Borsäure (0,2 mol/L) eingewogen, gelöst und der pH-Wert mit Natronlauge (1 mol/L) eingestellt. Die Analytlösung wird mit dem Puffer gemischt und durch Zugabe einer FMOC-Cl-Lösung (15 mmol/L in Aceton) derivatisiert. Die Zugabe von FMOC-Cl erfolgt zur Analyt / Puffer-Mischung im Volumenverhältnis 1:1, so daß ein deutlicher Überschuß an Derivatisierungsreagenz vorliegt. Die Derivatisierungszeit für Aminosäuren liegt in allen beschriebenen Fällen unter einer Minute. Die Entfernung von überschüssigem FMOC-Cl erfolgt anschließend entweder durch mehrmaliges Extrahieren mit Pentan oder durch nachfolgende Umsetzung mit dem relativ unpolaren 1-Aminoadamantan.

Für die Vorversuche zur Derivatisierung der amphoteren aromatischen Amine wurden Lösungen mit Massenkonzentrationen von $\beta = 20$ bis 40 mg/L an entsprechendem Amin angesetzt. Die Massenkonzentrationen entsprechen Stoffmengenkonzentrationen von 0,1 - 0,4 mmol/L. Um den hohen Wasseranteil von Realproben zu simulieren, wurde die entsprechende Einwaage in geringen Mengen Methanol gelöst und mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt. Zu 1 mL dieser Analytlösung wurden bei Raumtemperatur (RT = 20-22° C) 0,5 mL Pufferlösung und 0,5 mL einer Lösung von FMOC-Cl (15 mmol/L in Acetonitril) gegeben. Die Mischung mußte nach der Zugabe von FMOC-Cl kräftig geschüttelt werden, um das Derivatisierungsreagenz wieder vollständig in Lösung zu bringen. Die Derivatisierung wurde nach einer Minute durch Flüssig-flüssig-Extraktion mit Cyclohexan abgebrochen. Bei der Flüssig-flüssig-Extraktion wurde Cyclohexan dem Pentan vorgezogen. Cyclohexan besitzt annähernd die gleichen chemischen Eigenschaften, ist aber aufgrund des deutlich höheren Siedepunktes gesundheitlich unbedenklicher. Die Flüssig-flüssig-Extraktion wurde 3 mal mit 1 mL Cyclohexan durchgeführt.

Die HPLC-Trennung der gebildeten Derivate wurde in Anlehnung an die Arbeit von BÖHME [67] mit einem Methanol / Phosphatpuffer (pH = 7,0) Gemisch durchgeführt. Auf die Zugabe eines Ionenpaarreagenzes (Tetrabutylammoniumhydrogensulfat) wurde verzichtet, da die derivatisierten Analyte relativ unpolar sind.

Die Derivatisierungsausbeute wurde durch Vergleich der Peakfläche des Signals des underivatisierten Analyts, bei einer mit Puffer und Acetonitril entsprechend verdünnten Stammlösung des Analyten, mit der Peakfläche nach durchgeführter Derivatisierung ermittelt. Die Trennung des underivatisierten Analyts vom Injektionssignal erfolgte bei einem Verhältnis der Eluenten Puffer/Methanol (95:5, v/v). Selbst bei diesem hohen Wasseranteil ist es für einige Analyte nicht möglich, das Signal des underivatisierten Analyten vom Systempeak getrennt zu detektieren.

Um zu überprüfen, ob die Abnahme des Signals des underivatisierten Analyts auf eine Derivatisierung zurückzuführen ist, wurde das entstehende Derivat mit Puffer/Methanol (30:70, v/v) eluiert.

Da mit Verlängerung der Derivatisierungszeit eine weitere Abnahme des Ausgangssignals beobachtet wurde (Tab.25), wurden weitere Derivatisierungen über Nacht durchgeführt. Die dabei erhaltenen Ausbeuten sind in Tab.26 wiedergegeben. Für einige Analyte wie die Aminophenole und die Aminobenzoessäuren wird nach einer Derivatisierungszeit von 16 h eine fast quantitative Umsetzung beobachtet. Bei anderen Substanzklassen (Aminobenzol- und Aminotoluolsulfonsäuren) ist die Derivatisierungsausbeute dagegen deutlich geringer und ist für einzelne Substanzen, die eine Nitro-Gruppe enthalten, vernachlässigbar gering. In den folgenden Kapiteln wird daher eine Optimierung der Derivatisierungsbedingungen angestrebt.

Tab.25: Abnahme der Peakfläche des Signals des underivatisierten Analyts (4ABSS) mit der Derivatisierungszeit

Derivatisierungszeit / min	Peakfläche underivatisierter Analyt
0	636.000
1	600.000
10	462.000
20	262.000
25	171.000
30	148.000
40	99.000

Tab.26: Derivatisierungsausbeuten einiger Analyte bei pH: 7,7 und einer Derivatisierungszeit von 16h

Analyt	Derivatisierungsausbeute / %
2ABS	99
3ABS	98
4ABS	97
5A2NBS	34
4ASS	96
2ABSS	23
3ABSS	93
4ABSS	74
2A5NBSS	25
2ATSS4	24
4ATSS2	97
4ATSS3	31
2ATSS5	56
2AP	>98
4AP	>98
2A4NP	>98

10 Optimierung der Derivatisierungs-Bedingungen

10.1 pH-Abhängigkeit der Derivatisierungsausbeute

Zur Ermittlung der pH-Abhängigkeit wurde die Derivatisierung bei den pH-Werten 10,0, 8,5, 6,5, 4,6 und 2,0 durchgeführt. Die Derivatisierungen erfolgten hierbei analog zu den Vorversuchen durch Vorlage von 1 mL Analyt (β = 30 mg/L) bei RT und Zugabe von 0,5 mL des entsprechenden Puffers sowie 0,5 mL FMOC-Cl-Lösung (15 mmol/L in Acetonitril). Nach Zugabe des Derivatisierungsreagenzes wurde wieder für ca. eine Minute geschüttelt. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist in Tab.27 wiedergegeben. Die bei den einzelnen pH-Werten erzielten Derivatisierungsausbeuten der vier Analyte 2ABSS, 2ATSS4, 4ASS und 2ABS sind in Tab.28 aufgelistet. Ausgehend von Modellannahmen zum Reaktionsmechanismus (Abb.43), sollte ein pH-Wert kleiner 7 optimal sein. Die Derivatisierung wird durch einen nucleophilen Angriff des freien Elektronenpaars des Stickstoffs der Aminogruppe am elektropositiven Kohlenstoff der Carboxyl-Gruppe des FMOC-Cl initiiert. Durch die im sauren pH-Bereich erfolgte katalytisch wirksame Protonierung des Carboxyl-Sauerstoffs wird die Ladungstrennung innerhalb der Carbonylgruppe und damit die Derivatisierung begünstigt.

Im stark alkalischen pH-Bereich bei pH 10,0 ist, wie erwartet, die Derivatisierungsausbeute (DA) vernachlässigbar gering. Eine Erklärung für die Unterdrückung der Derivatisierungsreaktion könnte die bekannte Spaltung von Carbonsäurederivaten durch Hydroxy-Gruppen sein. Bei einem pH-Wert von 8,5 wird eine Derivatisierung beobachtet, die DA liegt aber immer noch unterhalb der bei pH 7,7. Eine deutliche Verbesserung wurde bei weiter abnehmendem pH-Wert gefunden. Im schwach Sauren bei pH 6,5 wird die größte DA erhalten. Mit weiter abnehmendem pH-Wert nimmt die DA wieder ab, liegt aber für viele Analyte bei einem pH-Wert von 4,6 noch höher als bei pH 7,7.

Die Abnahme der Ausbeute im stark sauren pH-Bereich (pH 2,0 und 4,6) lässt sich durch die bei diesem pH-Wert wahrscheinliche Protonierung der Aminogruppe, wodurch der zur Derivatisierung notwendige nucleophile Angriff unterdrückt wird, erklären.

Eine genauere Untersuchung in 0,5-pH-Schritten (Tab.29) zeigte, daß bei pH 6,0 eine geringfügig bessere, bei pH 7,0 dagegen eine Abnahme der Ausbeute gefunden wird. Eine weitere Verringerung des pH-Wertes auf 5,5 bzw. 5,0 brachte keine Verbesserung bzw. die Derivatisierungsausbeute ist sogar rückläufig, so daß der pH-Wert 6,0 als der am besten geeignete angesehen wird. Alle weiteren Derivatisierungen wurden nun bei einem pH von 6,0 durchgeführt.

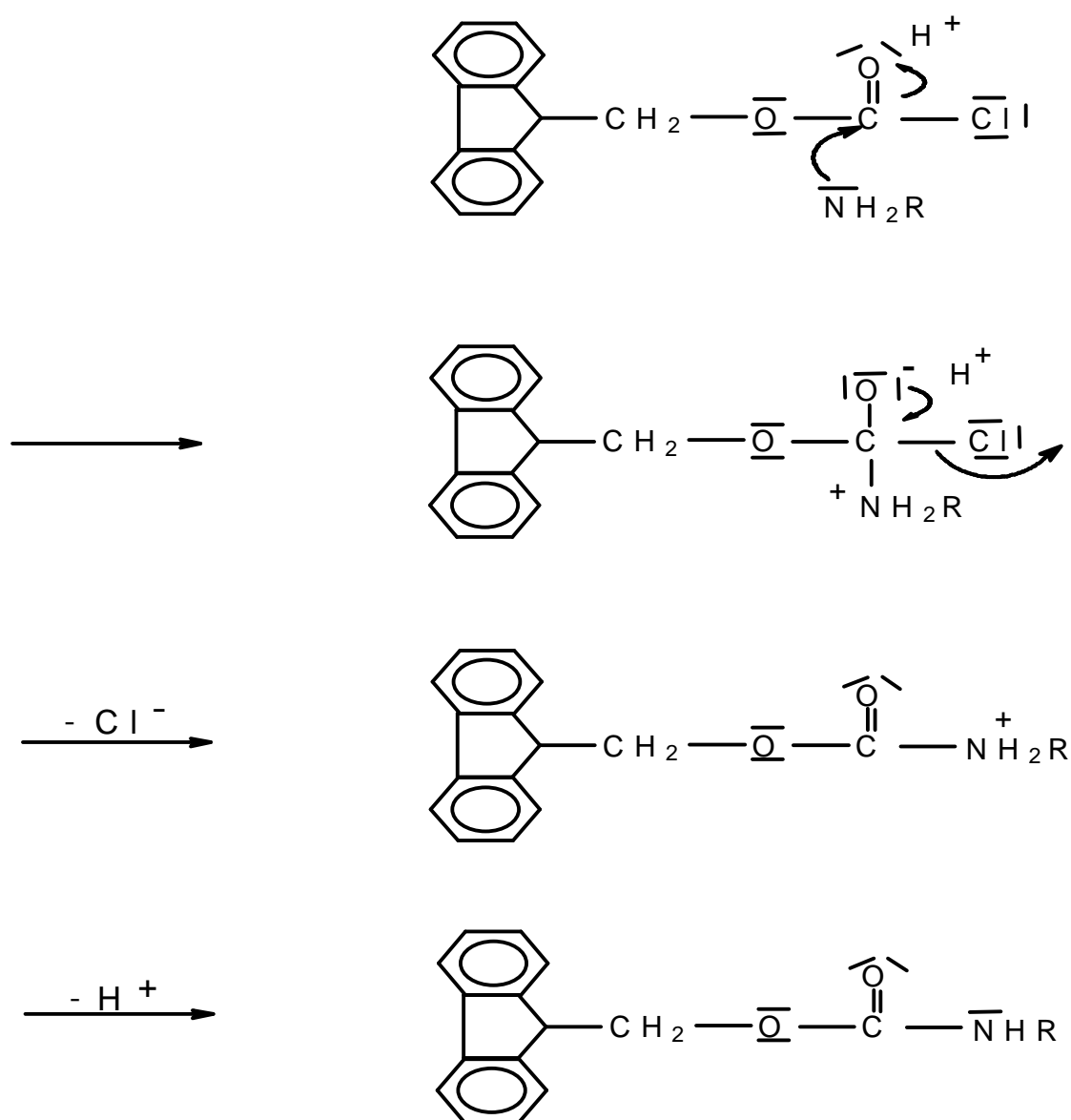


Abb.43: Modellannahme zum Reaktionsmechanismus der Derivatisierungsreaktion

10 Optimierung der Derivatisierungs-Bedingungen

Tab.27: Übersicht über die Herstellung der verwendeten Derivatisierungspuffer

pH-Wert	Zusammensetzung
10,0	NaHCO ₃ (0,1 mol/L) vorgelegt und mit Na ₂ CO ₃ (0,1 mol/L) eingestellt
8,5	H ₃ BO ₃ (0,2 mol/L) vorgelegt und mit NaOH (1 mol/L) eingestellt
7,7	H ₃ BO ₃ (0,2 mol/L) vorgelegt und mit NaOH (1 mol/L) eingestellt
7,0 6,5 6,0 5,5 5,0	KH ₂ PO ₄ (0,1 mol/L) vorgelegt und mit Na ₂ HPO ₄ (0,1 mol/L) eingestellt
4,6	NaCH ₃ COO (0,1 mol/L) vorgelegt und mit CH ₃ COOH (0,1 mol/L) eingestellt
2,0	Glycin ((CH ₂ NH ₂ COOH) 0,1 mol/L) und NaCl (0,1 mol/L) wurden vorgelegt und mit HCl (0,1 mol/L) eingestellt

Tab.28: Derivatisierungsausbeuten (%) einiger Analyte bei verschiedenen pH-Werten

pH	10	8,5	7,7	6,5	4,6	2,0
----- Analyt						
2ABSS	0 %	6 %	23 %	42 %	26 %	33 %
2ATSS4	0 %	4 %	24 %	72 %	56 %	52 %
4ASS	2 %	73 %	96 %	---- ^a	---- ^a	---- ^a
2ABS	6 %	100 %	99 %	98 %	99 %	96 %

^a nicht bestimmt

Tab.29: Derivatisierungsausbeuten (%) einiger Analyte bei verschiedenen pH-Werten

pH	7,0	6,5	6,0	5,5	5,0
----- Analyt					
2ABSS	24 %	30 %	31 %	25 %	27 %
2ATSS4	61 %	73 %	73 %	63 %	65 %

10.2 Zeit-Abhängigkeit der Derivatisierungsausbeute

Nach Literaturangaben [62, 63, 66] ist die Derivatisierung von Aminosäuren mit FMOC-Cl nach weniger als einer Minute abgeschlossen. Unsere Experimente zeigten, daß die Derivatisierung der amphoteren aromatischen Amine eine größere Zeitspanne benötigt. Für die Analyte 2-Aminobenzoesäure und 2-Aminotoluolsulfonsäure(4) wurde die Abhängigkeit der Derivatisierungsausbeute (DA) von der Derivatisierungszeit ermittelt. Diese Analyte wurden ausgewählt, da sie bei einer Derivatisierungszeit von 30 min eine meßbare DA besitzen, aber noch nicht vollständig derivatisiert sind (Tab.30). Die Derivatisierung wurde für diese Substanzen nach 0,5, 2, 4, 8, 16 und 66 h abgebrochen. Die Derivatisierung wurde bei Raumtemperatur ($RT = 20-22^{\circ}\text{C}$) und mit dem in Kap.12.1 als optimal erachteten Phosphat-Puffer ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) bei pH 6,0 durchgeführt. Zur Derivatisierung wurde 1 mL Analytlösung ($\beta_{\text{Analyt}} = 30 \text{ mg/L}$) mit 0,5 mL des Phosphat-Puffers und 0,5 mL FMOC-Cl-Lösung (15 mmol/L in Acetonitril) versetzt. Zum vollständigen Lösen des FMOC-Cl wurde die Mischung kräftig geschüttelt. Nach den erhaltenen Derivatisierungsausbeuten (Tab.30) zeigt sich für beide Analyte, daß bei längerer Derivatisierung als 4h keine Verbesserung der Ausbeute zu beobachten ist. Bei einer Verlängerung der Derivatisierungszeit auf ca. 16 h wird keine signifikante Verringerung der Ausbeute gefunden (Abb.44), aber es existiert dann der praktische Vorteil, daß die Derivatisierung über Nacht ablaufen kann. Während der bei der HPLC notwendigen Konditionierung der Trennsäule kann am nächsten Morgen ohne Zeitverlust die Aufarbeitung der Proben erfolgen. Bei einer Verlängerung der Derivatisierungszeit auf 66 h zeigt sich jedoch für beide Analyte eine geringe Abnahme der Derivatisierungsausbeute. Da diese Abnahme nur marginal ist, kann von einer hohen Stabilität der gebildeten Derivate bei Raumtemperatur ausgegangen werden (s. Kap.13.3).

Tab.30: Derivatisierungsausbeute in Abhängigkeit von der Derivatisierungszeit

Analyt	Derivat.-zeit / h	Derivat.-ausbeute / %
2ABSS	0,5	17
	2	35
	4	35
	8	36
	16	35
	66	30
2ATSS4	0,5	76
	2	86
	4	88
	8	87
	16	87
	66	66

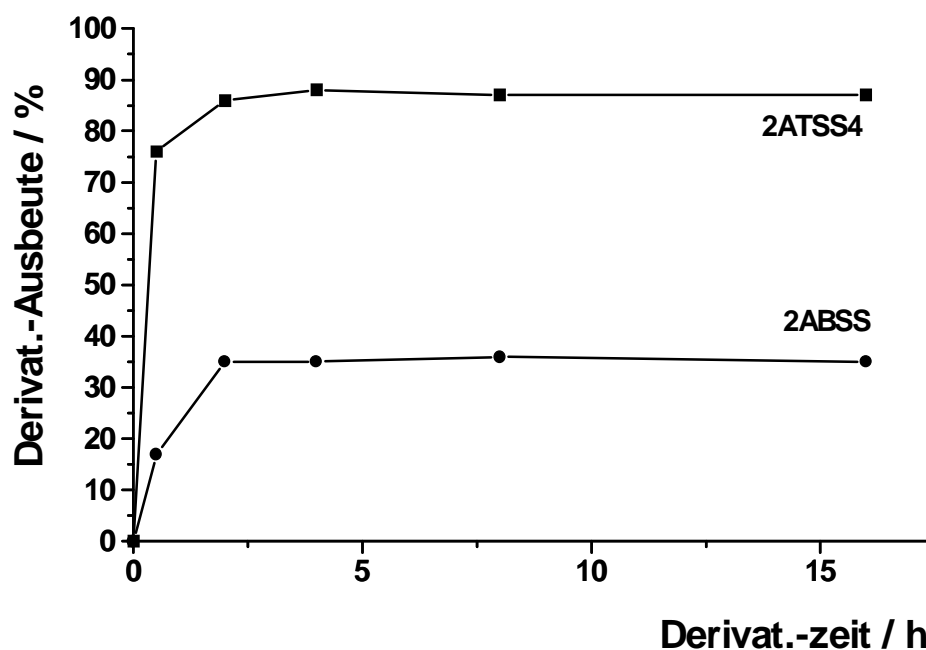


Abb.44: Abhängigkeit der Derivatisierungsausbeute von der Derivatisierungszeit

10.3 Temperatur-Abhängigkeit der Derivatisierungsausbeute

Da einige Analyte bei der Derivatisierung bei RT (20 - 22° C) nur eine verhältnismäßig geringe Derivatisierungsausbeute besitzen, wurde die Temperatur-Abhängigkeit der Derivatisierungsausbeute ermittelt. Zu diesem Zweck wurde die Derivatisierung von 2-Aminobenzolsulfonsäure und 2-Aminotoluolsulfonsäure(4) neben bei RT auch bei 40° und bei 10° C durchgeführt (Tab.31). Die Derivatisierung bei 40° C liefert durchweg geringere Ausbeuten als bei RT. Eine mögliche Begründung ist, daß bei höherer Temperatur der Zerfall der Derivate beschleunigt wird. Bei der Durchführung der Derivatisierung bei 10° C trat das praktische Problem auf, daß FMOC-Cl bei dieser Temperatur ausfällt. Um das FMOC-Cl in Lösung zu behalten, wurde die Derivatisierung in einem temperierbaren Schüttler durchgeführt. Die Derivatisierung bei 10° C lieferte sogar teilweise höhere Ausbeuten gegenüber der bei RT. Um auszuschließen, daß die höheren Ausbeuten auf das Schütteln zurückzuführen sind, wurde auch bei den beiden anderen Temperaturen die Derivatisierung über Nacht im Schüttler durchgeführt. Es zeigte sich, daß zwischen der über Nacht „gestandenen“ und der geschüttelten Lösung in Bezug auf die Derivatisierungsausbeute keine Unterschiede zu beobachten waren. Da nur für 2ATSS4 und auch nur in geringem Umfang eine Verbesserung der Ausbeute bei 10° C im Vergleich zur Derivatisierung bei RT zu beobachten ist, aber die Durchführung bei RT erheblich einfacher durchführbar ist, wurde die Derivatisierung weiterhin bei RT durchgeführt.

Tab.31: Derivatisierungsausbeuten (%) in Abhängigkeit von der Derivatisierungstemperatur

Temperatur	10° C	RT	40° C
----- Analyt			
2ABSS	29 %	31 %	23 %
2ATSS4	71 %	69 %	52 %

11 Arbeiten unter optimalen Derivatisierungsbedingungen

11.1 Ermittlung der Derivatisierungsausbeute

Für alle zur Verfügung stehenden Analyte wurde die Derivatisierungsausbeute (DA) unter den optimierten Derivatisierungsbedingungen ermittelt.

Die optimierten Derivatisierungsbedingungen sind:

- Zeit : 16 h
- Temperatur : RT (20-22 ° C)
- pH-Wert : 6,0.

Für die chromatographische Trennung des Signals des gebildeten Derivats vom Signal des überschüssigem FMOC-Cl wurde eine kurze HPLC-Säule (Länge: 125 mm, I.D.: 3mm) verwendet. Die Trennung wurde bei folgendem Gradientenprogramm realisiert:

- 0 - 9 min 60% Methanol : 40% wäßriger Phosphatpuffer (pH 2,5)
- 9 - 10 min linearer Gradient auf 80 : 20
- 10 - 19 min 80 : 20
- 19 - 20 min linearer Gradient auf 60 : 40

Die unter diesen Bedingungen bestimmten DA sind in Tab.32 wiedergegeben. Für den überwiegenden Teil der amphoteren Aminoaromaten wird die mit dem verwendeten HPLC-System erreichbare Nachweisgrenze der underivatisierten Analyte nach der Derivatisierung unterschritten, so daß von einer quantitativen Umsetzung ausgegangen werden kann. Ausnahmen bilden die 2-Aminobenzolsulfonsäure und einige Toluolsulfonsäuren. Bei 2ABSS und 4ATSS3 läßt sich die geringe DA durch die Nachbarschaft der sterisch anspruchsvollen Sulfonsäuregruppe erklären.

Bei der Derivatisierung der Aminonitrobenzoesäuren ist die DA erheblich geringer und bei einzelnen Substanzen vernachlässigbar gering. Diese Unterschiede in der DA lassen sich durch die elektronenziehende Wirkung der Nitrogruppen am Benzolring erklären. Bei der Betrachtung des wahrscheinlichen Reaktionsmechanismus der Derivatisierung (Abb.43) ist zur Derivatisierung ein nucleophiler Angriff des freien Elektronenpaares des Stickstoffs der Aminogruppe am Fmoc-Cl notwendig. Sind am aromatischen Ringsystem elektronenziehende Gruppen gebunden, ist die Nucleophilie des freien Elektronenpaares herabgesetzt. Wie die Abb.45 zeigt, ist dies vor allem in ortho- und para-Position zur Nitrogruppe besonders ausgeprägt. Befindet sich an einer dieser Positionen eine Aminogruppe läßt sich eine mesomere Grenzstruktur mit einer Doppelbindung des Stickstoffs der Aminogruppe zum aromatischen Ringsystem formulieren. In diesem Fall wird die Derivatisierung unterdrückt. Für 5-Amino-2-nitrobenzoesäure und 2-Amino-5-nitrobenzoesäure wird, wie nach obiger Theorie erwartet, keine Derivatisierung beobachtet. Bei 2-Amino-4-nitrobenzoesäure ist die Aminogruppe in meta-Position zur Nitrogruppe und die DA ist mit 60 % deutlich größer. Für die Aminonitrophenole wird eine DA von größer 95 % gefunden. Eine Ausnahme bildet hier 2-Amino-5-nitrophenol mit knapp 50 %. Diese geringe DA läßt sich ebenfalls durch die para-Position der Aminogruppe zur Nitrogruppe erklären.

Ein zusätzlicher Effekt ist, daß es sich bei einer Säuregruppe an einem aromatischen Ringsystem ebenfalls um einen elektronenziehenden Substituenten handelt. Die Gegenwart zweier elektronenziehenden Gruppen ist für die Derivatisierung besonders ungünstig. Diese These wird durch die hohe DA der Aminonitrophenole gestützt. Wird eine der beiden elektronenziehenden Gruppen (wie beim 4-Amino-3-nitrobenzoesäureethylester) verestert, steigt die DA auf bis zu 100 % an. Da eine Veresterung der Säuregruppe in wäßriger Lösung nicht möglich ist, wäre daher eine Erhöhung der DA nur durch eine Reduktion der Nitro- zur Aminogruppe zu erreichen [68]. In diesem Fall müßten zunächst die Fmoc-Derivate der amphoteren Aminoaromaten durch Festphasenextraktion abgetrennt und das Filtrat nach dem Reduktionsschritt ein zweites Mal der Derivatisierung zugeführt werden.

Tab.32: Derivatisierungsausbeuten (DA) mit und ohne Optimierung

(Alle DA sind Mittelwerte aus drei Bestimmungen (RSD 2-3 %))

Analyt	DA / % (pH: 6,0)	DA / % (pH: 7,7)
2ABS	> 98	> 98
3ABS	> 98	98
4ABS	> 98	97
3,4DABS	> 98	92
3,5DABS	> 98	n.b.
2A4NBS	61	n.b.
2A5NBS	15	n.b.
5A2NBS	< 2	34
2A4,6DNBS	4	n.b.
4A2,6DNBS	8	n.b.
4ASS	> 98	96
5ASS	> 98	> 98
2ABSS	39	23
3ABSS	> 98	93
4ABSS	> 98	74
2,5DABSS	> 98	95
2A5NBSS	< 2	25
2ATSS4	83	24
4ATSS2	> 98	97
4ATSS3	78	31
2ATSS5	> 98	56
2,6DATSS4	46	n.b.
4,6DATSS2	79	n.b.
2A4NTSS5	13	n.b.
2AP	> 98	> 98
3AP	> 98	> 98
4AP	> 98	> 98
2A3NP	95	n.b.
2A4NP	98	> 98
2A5NP	45	n.b.
4A3NBEE	> 98	82

n.b. = nicht bestimmt

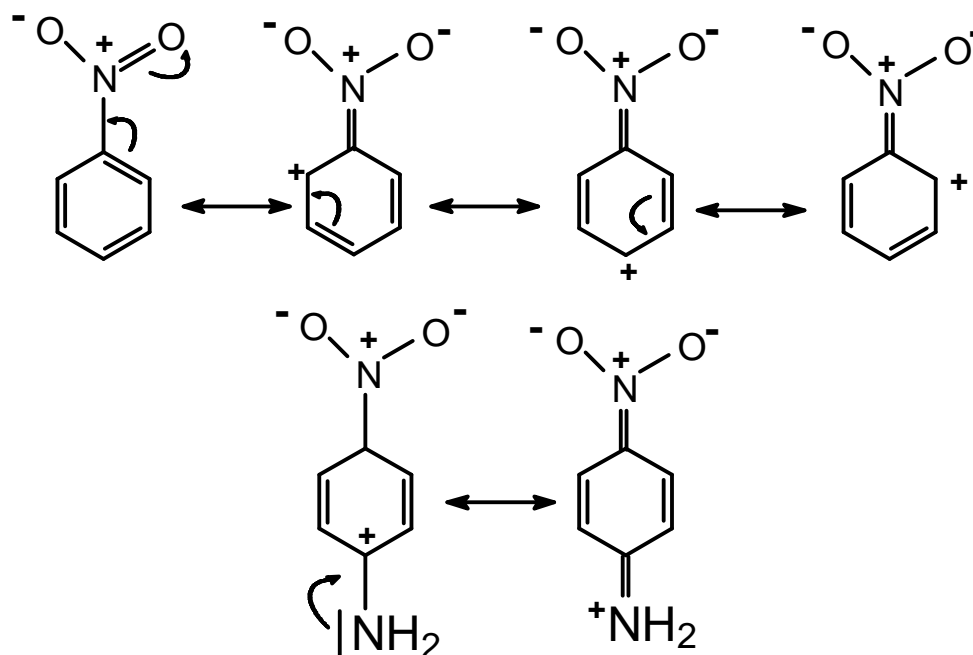


Abb.45: Einfluß einer Nitro-Gruppe auf die Derivatisierungsausbeute

11.2 Flüssig-flüssig Extraktion der Derivatlösungen

Aus der Literatur [60, 61, 64] ist bekannt, daß nach der Derivatisierung mit FMOC-Cl eine Aufreinigung erfolgen muß. Dazu wird eine Flüssig-flüssig-Extraktion mit Pentan oder die Umsetzung mit 1-Aminoadamantan vorgeschlagen. Wie zuvor erwähnt, wurde in dieser Arbeit bei der Flüssig-flüssig-Extraktion Cyclohexan anstelle von Pentan eingesetzt.

Bei Blindversuchen ohne Analyt wurden ohne Extraktion der Derivatlösung mit Cyclohexan im Chromatogramm drei Signale erhalten. Nach der Extraktion konnten die später eluierenden zwei Störsignale entfernt und das größte zuerst eluierende erheblich verringert werden. Die Störsignale sind auf die Reaktion des FMOC-Cl mit Wasser und Methanol, sowie unverbrauchtes FMOC-Cl zurückzuführen.

Bei Derivatisierungen mit einem Analyt konnte der obige Befund bestätigt werden. Die gebildeten Derivate sind jedoch aufgrund des großen Fluorenylretes des FMOC-Cl relativ unpolar, so daß bei der Extraktion auch das gebildete Derivat zum Teil herausextrahiert werden könnte. Die Peakhöhe und -fläche der Derivatssignale der untersuchten Analyte wurde daher vor und nach Extraktion der Derivatlösung mit Cyclohexan ermittelt.

Für die stark sauren Benzol- und Toluolsulfonsäuren wird praktisch kein Verlust an Derivat beobachtet. Die Derivate der Aminobenzoesäuren werden dagegen teilweise zu einem hohen Prozentsatz durch die Extraktion entfernt. Diese Tatsache lässt sich über die pK_s -Werte der Säuregruppe erklären. Bei einem pH-Wert von 6,0, bei dem die Derivatisierung durchgeführt wird, liegen die Aminobenzoesäuren zu einem nicht unerheblichen Teil protoniert vor. Von Carbonsäuren ist im undissoziierten Zustand die Bildung von Dimeren bekannt. Diese Dimere sind unpolarer und werden daher bei der Flüssig-flüssig-Extraktion aus der Probenlösung entfernt. Zur Vermeidung des hohen Extraktionsverlustes der derivatisierten Aminobenzoesäuren, wurde vor der Flüssig-flüssig-Extraktion die Probe mit einem Tropfen Natronlauge (1 mol/L) alkalisch gestellt. Bei diesem hohen pH-Wert liegen die Aminobenzoesäuren überwiegend dissoziiert vor. Die bei hohem pH-Wert beobachteten Extraktionsverluste der derivatisierten Aminobenzoesäuren waren vernachlässigbar gering (Tab.33).

Tab.33: pH-Abhängigkeit der Verluste durch Flüssig-flüssig-Extraktion für die derivatisierten Aminobenzoesäuren

Analyt	pH-Wert	Verlust an Peakhöhe	Verlust an Peakfläche
2ABSS	sauer	37%	34%
	alkalisch	3%	7%
3ABSS	sauer	15%	3%
	alkalisch	0%	0%
4ABSS	sauer	62%	60%
	alkalisch	5%	0%

11.3 Stabilität der erhaltenen Derivate

Um die Stabilität der gebildeten FMOC-Derivate der amphoteren Aminoaromaten zu ermitteln, wurden die Analyte 2ABS und 2ATSS4 derivatisiert. Die Derivatisierung wurde dabei für jeden Analyten zweimal unter den in Kap.12 als optimal erachteten Derivatisierungsbedingungen durchgeführt. Die erhaltenen Derivate wurden anschließend bei Raumtemperatur (RT = 20 - 22° C) und bei 4° C (im Kühlschrank) aufbewahrt. An den nächsten Tagen wurden die Derivatisierungslösungen chromatographisch auf der kurzen analytischen HPLC-Säule (Länge: 125 mm, I.D.: 3 mm) mit dem in Kap.11.1 beschriebenen Gradientenprogramm analysiert.

Die Auswertung zeigte, daß an verschiedenen Tagen unterschiedliche Peakhöhen und -flächen ermittelt werden. Wahrscheinliche Ursache ist der verwendete Autosampler (große Abweichung des aufgegebenen Probenvolumens zum Nennvolumen). Aus den erhaltenen Daten läßt sich als Abschätzung sagen, daß die Derivate über den untersuchten Zeitraum von 8 Tagen unter beiden Bedingungen stabil sind. Um die erhaltenen Daten miteinander vergleichen zu können, wurde sowohl für die Peakhöhe als auch die -fläche der Quotient unterderivatisiert zu derivatisiert gebildet. Die berechneten Größen sind in Tab.34 wiedergegeben. Anhand der berechneten Daten ist erkennbar, daß die Derivate sowohl bei RT als auch bei 4° C über 8 Tage stabil sind.

Tab.34: Stabilität der gebildeten FMOC-Derivate über die Zeit bei verschiedenen Temperaturen (Peakflächenverhältnis des Derivatsignals zum Signal des underivatisierten Analyts)

Tag	2ABSS - 4° C	2ABSS - RT	2ATSS4 - 4° C	2ATSS4 - RT
1	0,5	0,5	0,5	0,5
2	0,5	0,5	0,5	0,5
3	0,5	0,5	0,5	0,5
4	0,5	0,5	0,5	0,5
5	0,5	0,5	0,5	0,5
6	0,5	0,5	0,5	0,5
7	0,5	0,5	0,5	0,5
8	0,5	0,5	0,5	0,5

12 Trennung nach Derivatisierung

Zur Trennung der derivatisierten Analyte wurde eine längere Trennsäule (Länge: 250 mm; I.D.: 3 mm), die ebenfalls das Umkehrphasen-Material Lichrospher® 100 C-18 der Korngröße 5 µm enthält, verwendet. Die Derivatisierung der Analyte erfolgte unter den in Kap.11 als optimiert charakterisierten Bedingungen.

Erste Trennungen wurden mit einem Phosphatpuffer (pH = 7,0) und Methanol als Eluenten durchgeführt. Sehr schnell zeigte sich, daß bei diesem pH-Wert alle Analyte mit einer Säurefunktion deprotoniert, d.h. negativ geladen, vorliegen und aufgrund ihrer hohen Polarität sehr früh und in einem engen Zeitintervall eluiert werden. Eine Trennung der derivatisierten Analyte ist in diesem engen Zeitintervall nicht möglich.

Zur Verbesserung der Trennung wurde der pH-Wert des zur Trennung eingesetzten Phosphatpuffers auf 2,5 erniedrigt. Zur Herstellung des Puffers wurde eine Lösung von Natriumdihydrogenphosphat (10 mmol/L) mit Phosphorsäure (1 mol/L) auf den gewünschten pH-Wert eingestellt. Bei einem pH-Wert von 2,5 liegen nur die Analyte mit einer Sulfonsäuregruppe deprotoniert vor. Die Benzoesäuren sind protoniert und damit unpolarer, was sich in höheren Retentionszeiten für die Benzoesäurederivate bei niedrigerem pH-Wert der mobilen Phase zeigt.

Die in Tab.35 angegebenen Analyte wurden derivatisiert und mit folgendem Gradientenprogramm getrennt:

- 0 - 15 min 60% Methanol : 40% wäßriger Phosphatpuffer (pH 2,5)
- 15 - 17 min Übergang zu 80 : 20
- 17 - 27 min 80 : 20
- 27 - 29 min Übergang zu 60 : 40

Tab.35: Zusammensetzung der Mischungen derivatisierter Aminoaromaten

Mischung 1	Mischung 2	Mischung 3	Mischung 4
2 ATSS4	2,5 DABSS	2,6 DATSS4	4,6 DATSS2
3 ABSS	2 ATSS5	4 ATSS2	4 ABSS
3,5 DABS	2 ABSS	4 AP	4 ATSS3
4 ABS	3 AP	4 ASS	3,4 DABS
2 AP	3 ABS	2 ABS	5 ASS

Die erhaltenen Chromatogramme sind in den Abb.46 a bis d dargestellt. Die Peakzuordnung erfolgte aus Chromatogrammen der derivatisierten Einzelsubstanzen und aus dem Vergleich der Retentionszeiten.

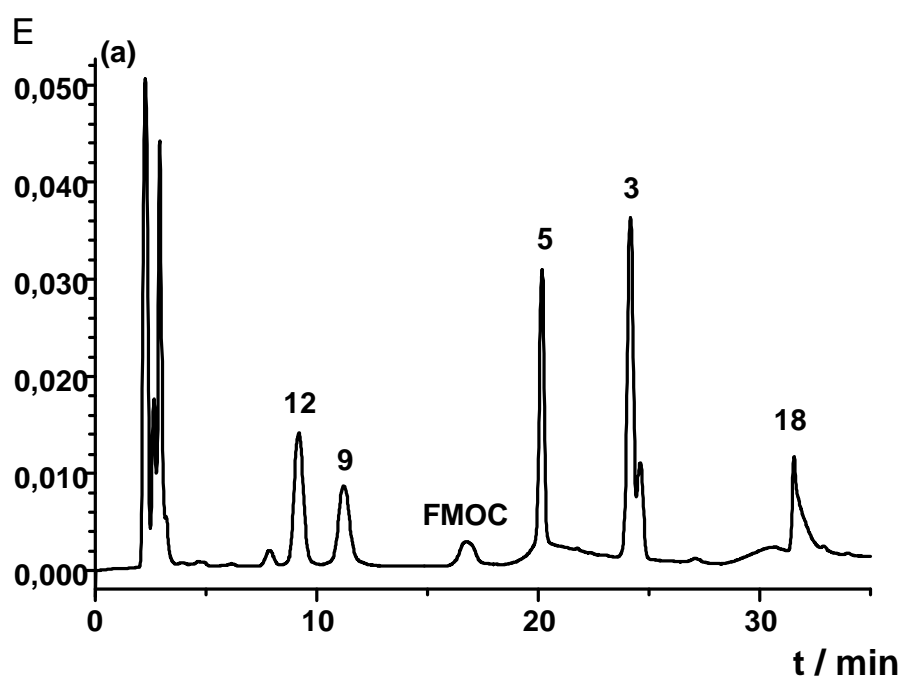


Abb.46: Fortsetzung nächste Seite

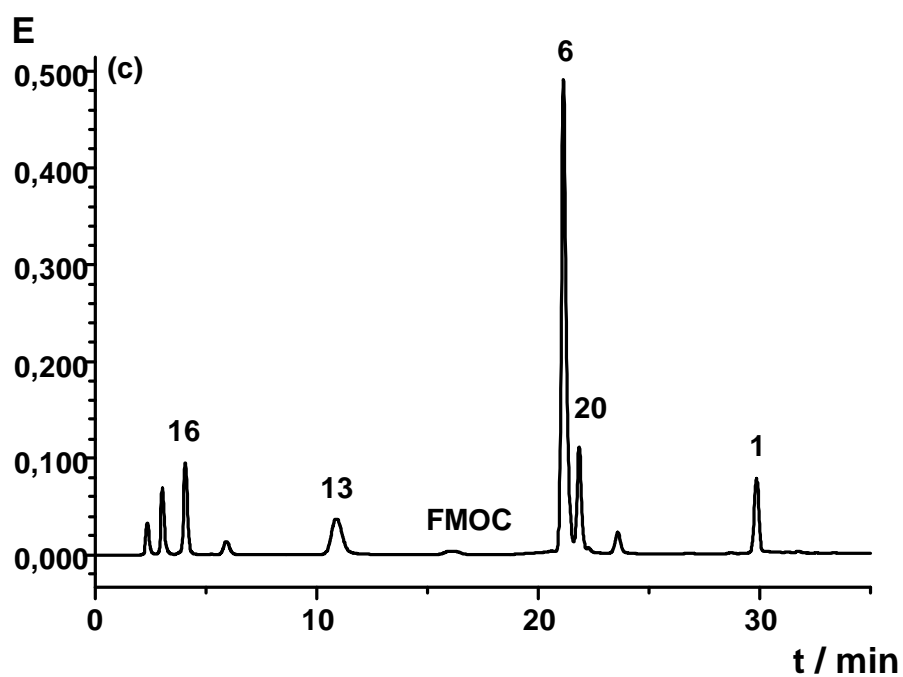
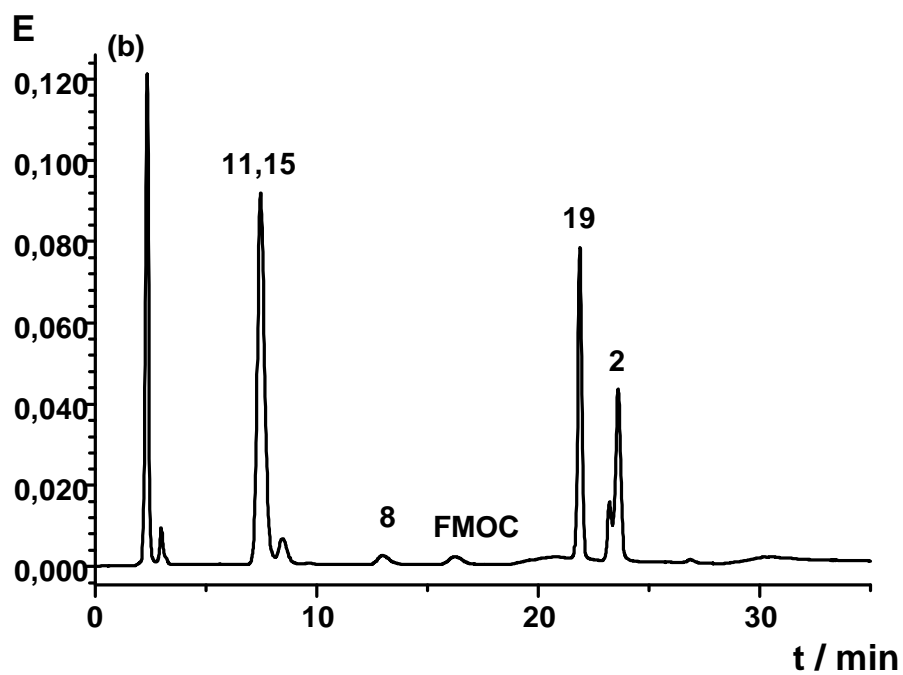


Abb.46: Fortsetzung nächste Seite

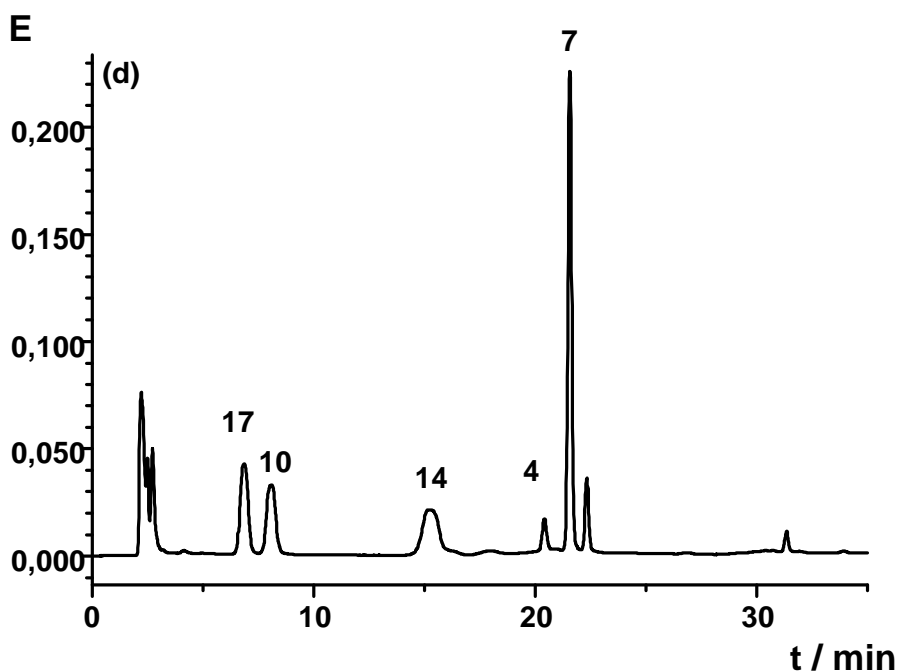


Abb.46: Trennung derivatisierter amphoterer aromatischeer Amine (a-d = M1-M4)

(Mobile Phase: Methanol/Phosphatpuffer (pH 2,5), Trennsäule: Länge: 250 mm; I.D.: 3 mm, stationäre Phase: Lichrospher® 100 C-18, dp: 5 µm)

(Peakzuordnung: 1 = 2ABS, 2 = 3ABS, 3 = 4ABS, 4 = 3,4DABS, 5 = 3,5DABS, 6 = 4ASS, 7 = 5ASS, 8 = 2ABSS, 9 = 3ABSS, 10 = 4ABSS, 11 = 2,5DABSS, 12 = 2ATSS4, 13 = 4ATSS2, 14 = 4ATSS3, 15 = 2ATSS5, 16 = 2,6DATSS4, 17 = 4,6DATSS2, 18 = 2AP, 19 = 3AP, 20 = 4AP)

13 Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden die in Kap.12 durchgeführten chromatographischen Trennungen von derivatisierten amphoteren Aminoaromaten mit geringeren Analytkonzentrationen wiederholt. Die gewählten Analytkonzentrationen lagen zwischen 0,25 und 9 mg/L (7 Datenpunkte). Die Analytkonzentrationen wurden durch Verdünnen einer Stammlösung mit bidestilliertem Wasser auf 1 mL erhalten. Zu dieser Lösung wurden 0,5 mL Puffer (pH 6,0) und 0,5 mL FMOC gegeben. Zur Entfernung von überschüssigem FMOC und seinen Hydrolyseprodukten wurde die Probelösung dreimal mit 1 mL Cyclohexan extrahiert.

Für alle untersuchten Analyte ergab sich nach Derivatisierung und anschließender Extraktion ein linearer Zusammenhang zwischen der Analytkonzentration und der Peakhöhe und -fläche des Derivatsignals (Abb.47). Die erhaltenen Korrelationskoeffizienten der berechneten Kalibriergeraden liegen zwischen 0,99992 und 0,99035, wobei die Auswertung nach der Peakfläche bessere Ergebnisse lieferte.

Alle in dieser Arbeit angegebenen Werte zur Derivatisierung amphoterer Aminoaromaten sind durch Dreifachbestimmung erhalten worden. Für die Kalibriergeraden wird im folgenden auf die Wiederholpräzision der erhaltenen Daten eingegangen. Die relative Standardabweichung (RSD) für die wiederholten Bestimmungen ist überwiegend für die Auswertung nach der Peakfläche günstiger als für die nach der Peakhöhe. Die Werte für die RSD liegen bei der Auswertung nach der Peakfläche zwischen 0,01 und 6,1 %, wobei die RSD mit abnehmender Massenkonzentration an Analyt erwartungsgemäß schlechter wird. Für die Peakhöhenauswertung liegen die Werte für die RSD zwischen 0,1 und 11,7 %.

Aus den Chromatogrammen der Kalibriergeraden mit der kleinsten noch auswertbaren Analytkonzentration wurde für jeden Analyten nach der 3 σ - bzw. 6 σ -Regel die Nachweis (NG) und Bestimmungsgrenze (BG) ermittelt (Tab.35). Die mit der optimierten Derivatisierungsmethode mit anschließendem HPLC-Trennverfahren erzielbaren NG liegen zwischen 13 und 71 $\mu\text{g/L}$ und die BG zwischen 27 und 141 $\mu\text{g/L}$. Für 2ABSS und 4ATSS3 liegen die Werte für die NG und die BG deutlich schlechter. Die hohen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für diese Analyte sind vor allem auf die geringe Derivatisierungsausbeute (sterische Hinderung durch die ortho-ständige Sulfonsäuregruppe) zu erklären.

Für die spezielle Fragestellung der Derivatisierung von Sprengstoffrückständen und deren Abbauprodukten erscheint das Derivatisierungsreagenz FMOC-Cl ungeeignet. Positiver lässt sich dagegen der Einsatz von FMOC-Cl als Derivatisierungsreagenz für die allgemeine Bestimmung von umweltrelevanten aromatischen Aminen beurteilen. Die von LONGO und CAVALLARO [69] zur Quantifizierung in Umweltfragen vorgeschlagenen 73 aromatischen Amine sollten mit FMOC-Cl in sehr guten Ausbeuten derivatisiert werden können.

Für umweltrelevante Fragestellungen sind NG von 1 µg/L gefordert. Ohne Voranreicherungsschritt wäre das vorgestellte Verfahren ungeeignet für den Einsatz zur Trinkwasseranalyse. Die Derivate mit FMOC-Cl sind fluoreszierend. Eine erhebliche Verbesserung der NG und BG (etwa eine Größenordnung) durch den Einsatz eines Fluoreszenzdetektors anstelle des hier verwendeten Photodiodenarray-Detektors zu erwarten ist.

Tab.35: Nachweis- (NG) und Bestimmungsgrenze (BG) ausgewählter derivatisierter Aminoaromaten und deren Korrelationskoeffizienten R für die Peakhöhe und die Peakfläche

Analyt	NG / (µg/L)	BG / (µg/L)	R (Peakfläche)	R (Peakhöhe)
2ABS	13	27	0,99983	0,99984
3ABS	28	56	0,99949	0,99964
2ABSS	330	660	0,99899	0,99786
3ABSS	29	59	0,99941	0,99857
4ABSS	59	117	0,99873	0,99863
2ATSS4	41	82	0,99746	0,99629
4ATSS2	57	114	0,99858	0,99992
4ATSS3	224	448	0,99753	0,99035
2ATSS5	71	141	0,96787	0,99992

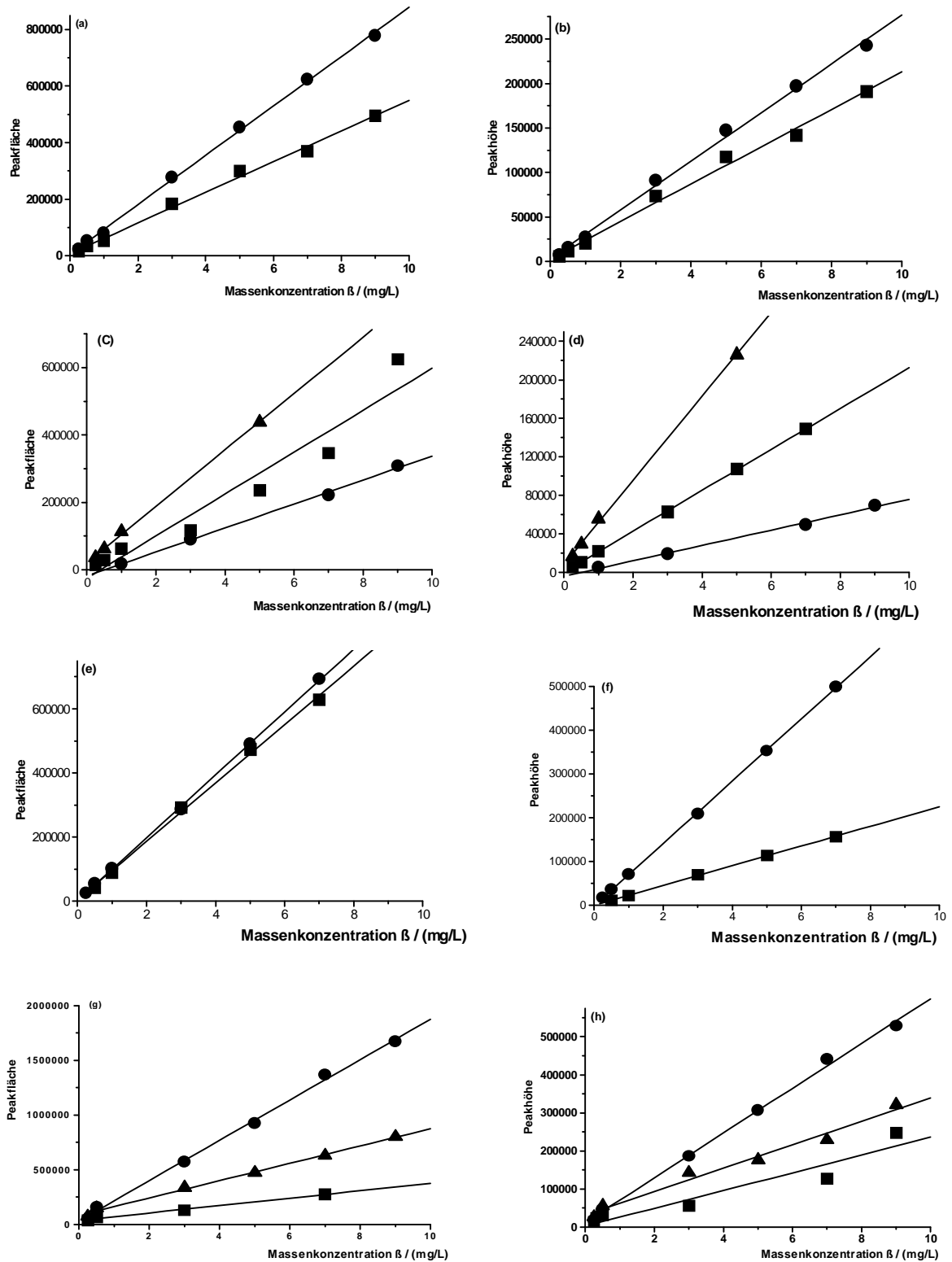


Abb.47: Auftragung der Analytkonzentration gegen die Peakfläche (a,c,e,g) bzw. die Peakhöhe (b,d,f,h)

(Zuordnung: (a,b): ● = 2ATSS4, ■ = 3ABSS

(c,d): ● = 2ABSS, ■ = 2ATSS5, ▲ = 3ABS

(e,f): ● = 2ABS, ■ = 4ATSS2

(g,h): ● = 4ABSS, ■ = 4ATSS3, ▲ = 4,6DAT2SS

(Mobile Phase: Methanol/Phosphatpuffer (pH 2,5), Trennsäule: Länge: 250 mm; I.D.: 3 mm, stationäre Phase: Lichrospher® 100 C-18, dp: 5 μ m)

14 Trennung der derivatisierten Analyte mit der MEKC

14.1 Einführung

Die Analytik komplexer Proben aus Umwelt, industrieller Produktion und Pharmazie erfordert leistungsfähige Trennmethoden. Die Anforderungen, die an eine analytische Methode gestellt werden, sind Identifizierung und Quantifizierung der Komponenten bei hoher Selektivität und Reproduzierbarkeit in möglichst kurzer Zeit. Die für die Analytik benötigten Probenvolumina sollten möglichst klein sein, da Analysenproben, die z.B. aus biologischen Extrakten erhalten werden, häufig nur in begrenzten Mengen zur Verfügung stehen.

Während die HPLC eine Methode ist, die in zahlreichen Routineverfahren eingesetzt wird, ist die MEKC als potentiell leistungsfähigere Methode aufzufassen. Die MEKC weist gegenüber der HPLC einen deutlich geringeren Verbrauch an mobiler Phase, geringere Probenvolumina, kürzere Analysenzeiten und vor allem eine bessere unter Routinebedingungen erreichbare Trennleistung auf (Trennstufenzahlen $N > 200.000$ gegenüber $N < 50.000$ bei der HPLC). Die Routinetauglichkeit der MEKC ist jedoch noch nicht hinreichend durch Experimente mit Realproben bewiesen.

Das Problem der irreversiblen Sorption von Matrixbestandteilen einer Realprobe an der stationären Phase wie bei der HPLC, stellt sich wegen der Abwesenheit einer echten stationären Phase bei der MEKC nicht. Auf Probenvorbereitungsschritte kann in der MEKC nahezu verzichtet werden, da die pseudostationäre Phase nach jeder Trennung durch Spülen ausgetauscht wird. In der Literatur wird die direkte Analyse von Körperflüssigkeiten und Getränken unter Anwendung der MEKC berichtet [70,71].

Matrixbestandteile können jedoch in der MEKC auf zweierlei Weise ganz besonders große Probleme verursachen. Wiederholpräzision, Reproduzierbarkeit und Robustheit in der MEKC sind davon abhängig, daß der elektroosmotische Fluß (EOF) über mehrere Trennungen hinweg konstant gehalten werden kann.

Findet Sorption von Matrixbestandteilen an der Innenwandung der Trennkapillare statt, so wird der EOF reduziert, mit entsprechenden Konsequenzen für die obengenannten Leistungsmerkmale des Verfahrens. Abhilfe können hierbei zwischen den Trennungen drastische Spülschritte mit Natronlauge oder Salpetersäure schaffen.

Die MEKC wird häufig zur Trennung hydrophober wasserunlöslicher Bestandteile eingesetzt. Diese Proben enthalten dann einen hohen Anteil an organischem Lösungsmittel. Bei der Derivatisierung von amphoteren Aminoaromaten mit FMOC-Cl liegt der organische Anteil der Probe bei > 25 %. Bei der Untersuchung des Einflusses der Probenzusammensetzung in Bezug auf deren organischen Anteil ergab sich (Kap.5.1), daß mit zunehmenden Anteil an organischem Lösungsmittel in der Probe die Peakhöhe und die für ein Peakpaar erreichbare Auflösung abnehmen und gleichzeitig die Peakbreite zunimmt. Aufgrund des erhöhten organischen Anteils in der Probe wird in der Probenzone das Verteilungsgleichgewicht der Analyte zwischen wäßriger und mizellarer Phase in Richtung wäßriger Phase verschoben.

K. D. ALTRIA [72] berichtet aus seinen Untersuchungen zur Zusammensetzung der Probe, daß bei einem höheren Anteil organischen Lösungsmittel in der Probe die Zugabe einer geringen Menge Natriumdodecylsulfat (SDS) (bis zu 10 mmol/L) Abhilfe bei dem Phänomen der Bandenverbreiterung schafft.

In der Dissertation von MUSSENBROCK [73] wurde die Bestimmung von Explosivstoffen in Böden mit Hilfe der HPLC und der MEKC vergleichend gegenübergestellt (veröffentlicht in [74,75]). MUSSENBROCK hebt heraus, daß sich mit der MEKC bei nur geringfügig schlechterer Bestimmungsgrenze als im HPLC-Vergleichsverfahren hervorragende Trennungen aller zu bestimmenden Komponenten in weitaus kürzerer Zeit realisieren lassen. Die Arbeit von MUSSENBROCK zählt zu den wenigen, in denen ein MEKC-Verfahren und ein HPLC-Verfahren durch Anwendung auf umweltrelevante Realproben vergleichend einander gegenübergestellt wurden.

WATANABE et al. [76] verwendeten die MEKC und die HPLC zur Bestimmung von vier phenolischen Inhaltsstoffen einer japanischen Spirituose. Sie weisen daraufhin, daß die MEKC aufgrund der geringen Analysenkosten und den kürzeren Analysenzeiten eine interessante Alternative zur HPLC darstellt.

FARAN et al. [77] untersuchten die Einsatzmöglichkeit der HPLC und der MEKC zur Bestimmung von neutralen und anionischen Pestiziden. Sie beobachteten für das HPLC-Verfahren eine geringere Effizienz als für das MEKC-Verfahren. Gleichzeitig ist aber die NG für die Bestimmung aller Pestizide in der MEKC schlechter als in der HPLC. Durch einen Aufkonzentrierungsschritt in der Kapillare gelingt es ihnen für die Bestimmung anionischer Pestizide mit der MEKC für die NG in Bereiche der HPLC vorzudringen.

VANDEGINSTE et al. [78] entwickelten ein MEKC-Verfahren, das in Bezug auf die Peakkapazität (Basislinientrennung aller untersuchten Lipide), einem IUPAC HPLC-Verfahren (keine Basislinientrennung) überlegen ist. Die Wiederholpräzision ist dagegen schlechter als im IUPAC HPLC-Verfahren.

14.2 Trennung mit anionischem Tensid

Für die Entwicklung eines geeigneten MEKC-Verfahrens wurden die Aminobenzolsulfonsäuren und die Aminotoluolsulfonsäuren als Testanalyte ausgewählt. Erste Versuche zur Trennung der gebildeten Derivate mit einem Trennelektrolyten mit einer SDS-Konzentration von 20 mmol/L bei einem pH-Wert von 9,0 und direkter Injektion der Derivatlösung lieferten nur breite schlecht aufgelöste Signale. Ein Zusatz von SDS ($c_{\text{SDS}} = 10 \text{ mmol/L}$) zur Probe nach Beendigung der Derivatisierung erbrachte entgegen den Ergebnissen von K. D. ALTRIA [72] keine Verbesserung.

Im Arbeitskreis wurden für die Trennung von unpolaren Analyten bei Verwendung eines anionischen Tensids (Natriumdodecylsulfat, SDS) Harnstoff und Acetonitril gleichzeitig als Modifier im Trennelektrolyten eingesetzt. Auf diese Weise gelang die Trennung von 11 biogenen Aminen, die mit Dansylchlorid derivatisiert wurden [37].

Die bei der Derivatisierung mit FMOC-Cl gebildeten Carbaminsäureester sind ebenfalls als stark unpolar anzusehen, so daß der Einsatz von Acetonitril und Harnstoff als Modifier im Trennelektrolyt angezeigt ist. Zusätzlich könnte durch den Zusatz von Acetonitril zum Trennelektrolyten das Phänomen der Bandenverbreiterung unterdrückt werden.

Zur Optimierung der Trennung wurden bei einer SDS-Konzentration von 20 mmol/L die Harnstoffkonzentration und der Volumenanteil an Acetonitril im Trennelektrolyt variiert. Die Harnstoffkonzentration wurde dabei von 0 bis 3 mol/L in 1 mol/L-Schritten erhöht und der Volumenanteil Acetonitril von 0 bis 25 % (v/v) in 5 %-Schritten. Die alleinige Zugabe von Harnstoff als Modifier führte erst ab einer Konzentration von 2 mol/L im Trennelektrolyten zu einer Trennung aller derivatisierten Analyte, wobei keine Basislinientrennung vorlag. Durch eine weitere Erhöhung wurde die Trennung nicht verbessert. Bei Zugabe von Acetonitril war schon bei einem Volumenanteil von 5 % eine Trennung aller Analyte erkennbar. Ein größerer Volumenanteil Acetonitril im Trennelektrolyten brachte keine Vorteile. Die Kombination von Harnstoff und Acetonitril liefert bei einem Volumenanteil Acetonitril von 5 % und einer Harnstoffkonzentration von 1 mol/L das beste Ergebnis. Für bessere Trennergebnisse wurde der Volumenanteil Acetonitril später auf 7,5 % erhöht. Durch den Volumenanteil Acetonitril konnte, wie erhofft, das Problem der Bandenverbreiterung unterdrückt werden.

Zwischen den chromatographischen Trennungen wurde die Kapillare für 2 min mit Natronlauge (0,1 mol/L) gespült. Diese Spülprozedur wurde gewählt, um ein Abscheiden von FMOC-Cl an der Kapillarinnenwand zu vermeiden. Anschließend wurde die Kapillare für 4 min wieder mit dem Trennpuffer konditioniert.

In Abb.48 sind die mit der MEKC unter optimierten Bedingungen erhaltenen Trennungen der Aminobenzolsulfonsäuren (a) und der Aminotoluolsulfonsäuren (b) dargestellt.

Die mit der MEKC unter den oben genannten Bedingungen erzielten Ergebnisse sind im Kapitel 14.2 den mit der HPLC erzielten vergleichend gegenübergestellt.

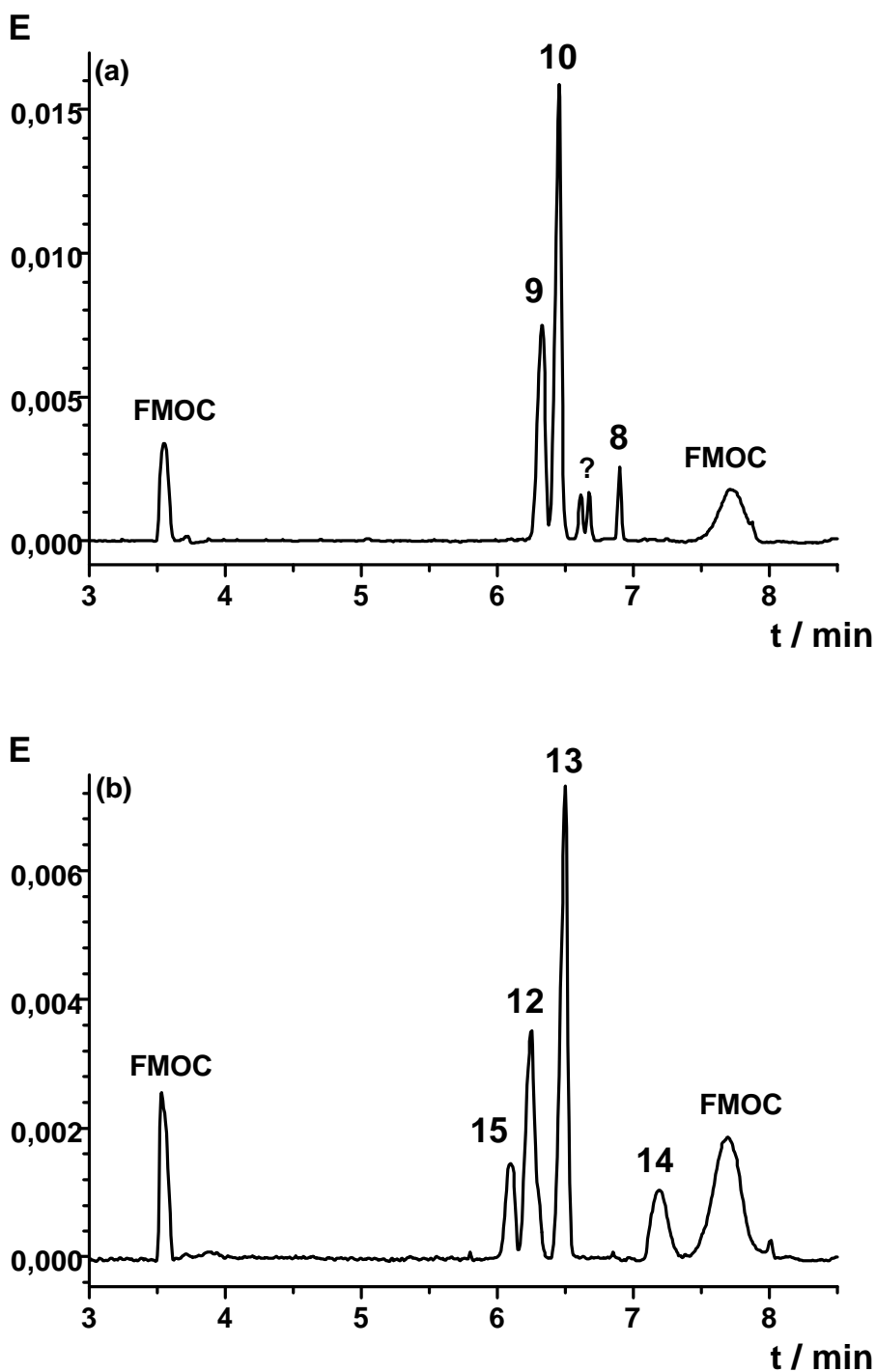


Abb.48: Trennung von derivatisierten amphoteren Aminoaromaten ((a) = ABSS, (b) = ATSS)

(Peakzuordnung: 1 = 2ABS, 2 = 3ABS, 3 = 4ABS, 12 = 2ATSS4, 13 = 4ATSS2, 14 = 4ATSS3, 15 = 2ATSS5)

(Meßbedingungen: Trennelektrolyt: $c(\text{SDS}) = 20 \text{ mmol/L}$, 1 mol/L Harnstoff, $7,5 \%$ (v/v) Acetonitril; $c(\text{H}_3\text{BO}_3) = 10 \text{ mmol/L}$, $c(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7) = 10 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 9,0$; Kapillare: $75 \mu\text{m}$ I.D., 50 cm effektive Länge, 57 cm Gesamtlänge; Analysenspannung 25 kV ; Temperatur 25°C ; Probenaufgabe: Druckinjektion 10 s)

14.3 Vergleich des MEKC-Verfahrens mit dem HPLC-Verfahren

Zum Vergleich der mit den beiden Trennmethoden MEKC und HPLC erarbeiteten Bestimmungsverfahren wurde die Bestimmung der derivatisierten Aminobenzolsulfonsäuren und Aminotoluolsulfonsäuren herangezogen. In Abb.49 sind die Chromatogramme der derivatisierten synthetischen Proben für die MEKC- und die HPLC-Trennung einander gegenübergestellt. Zur Realisierung einer Trennung unter vergleichbarer Auflösung werden bei der MEKC-Methode deutlich kürzere Analysenzeiten benötigt. Auffällig ist, daß beim MEKC- und beim HPLC-Verfahren unterschiedliche Selektivitäten (Änderung der Elutionsreihenfolge) zu beobachten sind. Die von uns beobachtete Änderung der Selektivität läßt sich durch die unterschiedlichen Trennmechanismen erklären. Da alle Analyte bei pH 9,0 geladen vorliegen, ist für die Trennung mittels MEKC nicht nur Verteilung zwischen pseudostationärer und wäßriger Phase sondern auch Elektrophorese entscheidend. Für beide Trennmethoden wurde im gleichen Konzentrationsbereich von 0,25 bis 9 mg/L die Peakfläche bzw. Peakhöhe (ohne Normierung auf einen internen Standard) gegen die jeweilige Konzentration aufgetragen (Abb.50). Die für die beiden Bestimmungsverfahren ermittelten Korrelationskoeffizienten für die derivatisierten Aminobenzolsulfonsäuren und Aminotoluolsulfonsäuren sind Tab.36 zu entnehmen. Die berechneten Korrelationskoeffizienten sind für alle Analyte für beide Trennmethoden nahezu identisch. Eine Ausnahme bildet dabei nur das 4ATSS3. Hier werden durch das HPLC-Verfahren deutlich bessere Korrelationskoeffizienten erhalten.

Die nach der 3 σ - bzw. 6 σ -Regel ermittelten Nachweis- (NG) und Bestimmungsgrenzen (BG) für die derivatisierten Aminobenzolsulfonsäuren und Toluolsulfonsäuren sind in Tab.37 wiedergegeben. Für alle untersuchten Analyte wird für das HPLC-Verfahren eine größere Empfindlichkeit beobachtet. Die geringere Empfindlichkeit des MEKC-Verfahrens ist durch das geringere Probenvolumen von einigen nL (Probenaufgabe: Druckinjektion 10s) gegenüber 10 μ L des HPLC-Verfahrens sowie das geringe Detektionsvolumen zu erklären.

Analog zur HPLC lässt sich die NG und die BG auch für das MEKC-Verfahren durch Fluoreszenzdetektion der FMOC-Derivate (anstelle der hier genutzten photometrischen Detektion) verbessern. CHAN et al. [79] berichten von einem MEKC-System mit einem selbstgebaute Laserinduzierten Fluoreszenzdetektor (LIF) zur Detektion von FMOC-Derivaten von Aminosäuren. Die von ihnen ermittelten NG konnten durch dieses System zusätzlich um den Faktor 100 gegenüber Fluoreszenz-Detektion mit einer Xenon-Lampe als Strahlungsquelle verbessert werden.

Tab.36: Vergleich der Korrelationskoeffizienten für die Kalibriergeraden, die mit dem MEKC- und dem HPLC-Verfahren erzielt wurden

Analyt	MEKC		HPLC	
	Peakfläche	Peakhöhe	Peakfläche	Peakhöhe
2ABSS	0,99885	0,99427	0,99899	0,99786
3ABSS	0,99945	0,99891	0,99941	0,99857
4ABSS	0,99932	0,99903	0,99873	0,99863
2ATSS4	0,99816	0,99642	0,99746	0,99629
4ATSS2	0,99641	0,99197	0,99858	0,99992
4ATSS3	0,98686	0,92638	0,99753	0,99035
2ATSS5	0,99821	0,99956	0,96787	0,99992

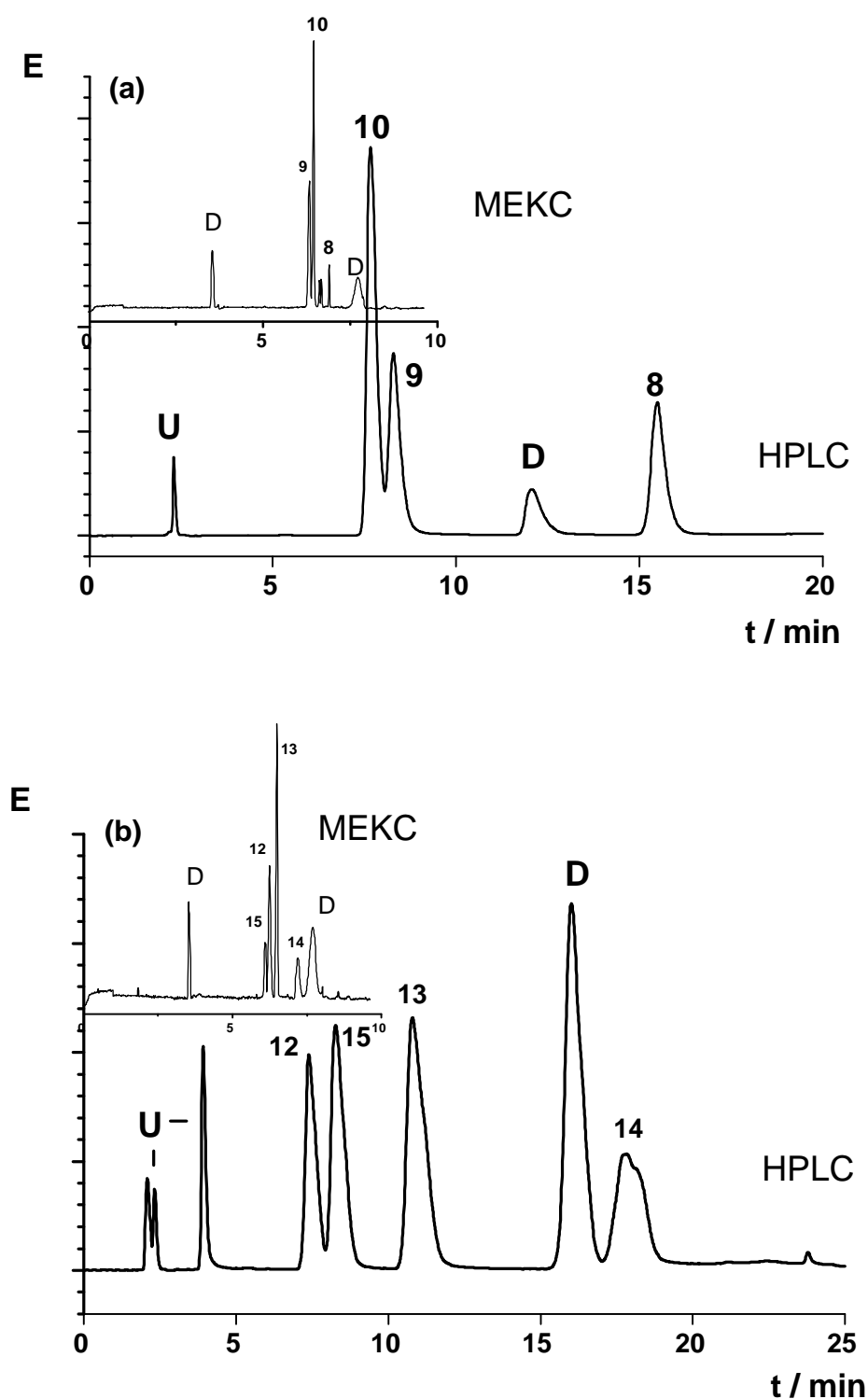


Abb.49: Vergleich der chromatographischen Trennungen von mit Fmoc-Cl derivatisierten Aminobenzolsulfonsäuren (a) und Aminotoluolsulfonsäuren (b) (Trennbedingungen: Siehe Abb.46 (HPLC) und Abb.48 (MEKC)) (Peakzuordnung: 8 = 2ABSS, 9 = 3ABSS, 10 = 4ABSS, 12 = 2ATSS4, 13 = 4ATSS2, 14= 4ATSS3, 15 = 2ATSS5, U = underivatisierter Analyt, D = Hydrolyse- und Nebenprodukte der Derivatisierung)

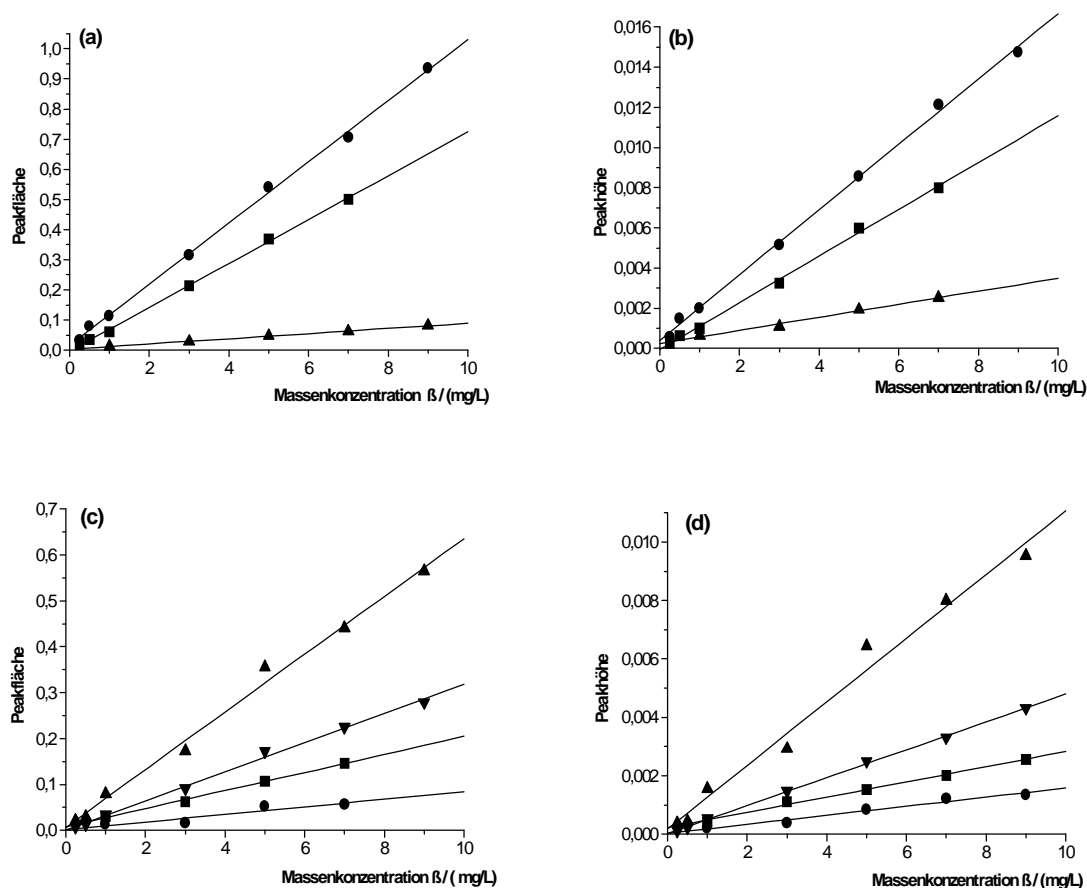


Abb.50: Auftragung der Analytkonzentration gegen die Peakfläche (a,c) bzw. die Peakhöhe (b,d)

(Zuordnung: (a,b): ● = 4ABSS, ■ = 3ABSS, ▲ = 2ABSS

(c,d): ● = 4ATSS3, ■ = 2ATSS4, ▲ = 4ATSS2, ▼ = 2ATSS5

(Meßbedingungen s. Abb.48)

Tab.37: Vergleichende Übersicht der mit den beiden Trennmethodeen erzielten Nachweis- (NWG) und Bestimmungsgrenzen (BG) für ausgewählte derivatisierte Aminoaromaten

Analyt	MEKC		HPLC	
	NG / ($\mu\text{g/L}$)	BG / ($\mu\text{g/L}$)	NG / ($\mu\text{g/L}$)	BG / ($\mu\text{g/L}$)
2ABSS	422	844	330	660
3ABSS	197	394	29	59
4ABSS	121	243	59	117
2ATSS4	552	1103	41	82
4ATSS2	172	345	57	114
4ATSS3	923	1847	224	448
2ATSS5	528	1056	71	141

15 Zusammenfassung

Die Mizellare Elektrokinetische Chromatographie (MEKC) kann als Spezialfall der Kapillarzonen-elektrophorese (CZE) betrachtet werden. Sie ermöglicht sowohl die Trennung geladener als auch ungeladener Komponenten einer Probe. Durch ihre hohe Effizienz und die Möglichkeit, die Selektivität des Trennsystems über einen sehr weiten Bereich einzustellen, wird sie zunehmend zu einer leistungsfähigen Konkurrenz für die HPLC. Ziel dieser Arbeit war es, Einsatzmöglichkeiten der MEKC aufzuzeigen. Insbesondere war von Interesse, ob auch kationische Tenside erfolgreich als Mizellenbildner in der MEKC zur Analyse von Realproben eingesetzt werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die drei homologen Alkyltrimethylammoniumbromide Dodecyltrimethylammoniumbromid (DoTAB), Tetradecyltrimethylammoniumbromid (TTAB) und Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) als kationische Mizellenbildner eingesetzt. Die vorgenannten Tenside unterscheiden sich nur in der Länge ihres Alkylkettenrestes (C_{12} , C_{14} , C_{16}).

Nach der Ermittlung der physiko-chemischen Daten wurde TTAB als das für den Einsatz in der MEKC am besten geeignete kationische Tensid ausgewählt. CTAB ist aufgrund seiner geringen Löslichkeit in wäßrigen Puffermedien und DoTAB aufgrund seiner hohen kritischen mizellaren Konzentration (CMC) ungeeignet für den Einsatz als Mizellenbildner in der MEKC.

In der Literatur werden verschiedene Wechselwirkungen (WW) zwischen dissoziierten negativ geladenen Analyten und den kationischen Tensid-Monomeren bzw. den kationischen Mizellen postuliert. Zur Beurteilung der beim Einsatz von kationischen Tensiden in der MEKC vorliegenden WW wurden acide und neutrale Analyte mit Trennelektrolyten getrennt, die kationische Tenside in einer Konzentration unter- und oberhalb der CMC enthielten. Die auf diese Weise erhaltenen Ergebnisse wurden mit Ergebnissen aus elektrophoretischen Trennungen und Trennungen mit einem SDS-haltigem Trennelektrolyten verglichen. Nach diesen Ergebnissen läßt sich sagen, daß für die anionische Spezies nur WW mit den positiv geladenen Mizellen nachgewiesen werden können. WW mit den Tensid-Monomeren können nach unseren Untersuchungen ausgeschlossen werden.

Vorteilhaft beim Einsatz von kationischen Tensiden als Mizellenbildnern ist der im Gegensatz zur Verwendung von SDS sehr weite pH-Bereich von 4,6 bis 9,0, in welchem MEKC im Normalmodus betrieben werden kann. Dieser weite pH-Bereich ermöglicht Selektivitäten, die mit SDS nicht möglich sind.

Nachteilig beim Einsatz von kationischen Tensiden als Mizellenbildner ist das schmale Retentionsfenster und damit die geringe Anzahl an Analyten, die während eines chromatographischen Laufs maximal getrennt werden können. Zur Aufweitung des Retentionsfensters wird bei Verwendung von SDS als Mizellenbildner Acetonitril und Harnstoff eingesetzt. Beim Einsatz von kationischen Tensiden als Mizellenbildnern erwiesen sich verschiedene organische Modifier als ungeeignet zur Aufweitung des Retentionsfensters. Es zeigte sich, daß zur Aufweitung des Retentionsfensters nur solche Modifier geeignet sind, die mit den Tensid-Monomeren um die Positionen an der Kapillareninnenwand konkurrieren. Gute Ergebnisse wurden mit kurzkettigen kationischen Tensiden (OTAB), EOF-Modifiern (TBAB, HMB) und Salzen zweiwertiger Metalle (CaCl_2) erzielt. Durch Zugabe dieser Modifier zum Trennelektrolyten gelang es, die Auflösung für ungeladene Analyte deutlich zu verbessern. Bei der Trennung negativ geladener Analyte wurde dagegen auch die Elutionsreihenfolge drastisch beeinflusst. Dieser Effekt kann gezielt zur Einstellung der Selektivität des Trennsystems genutzt werden.

Die Anwendbarkeit der MEKC mit kationischem Tensid auf Realproben konnte am Beispiel der Komponentenanalyse von kommerziellen Produkten, die mit natürlicher Vanille oder synthetisch erzeugten Aromastoffen versetzt sind, gezeigt werden.

Um die Anwendbarkeit der MEKC auf eine umweltchemische Fragestellung zu überprüfen, wurde als Problemstellung die Bestimmung amphoterer Amino- und Aminonitroaromaten gewählt. Zunächst wurde für diese Analyte ein Derivatisierungsverfahren mit FMOC-Cl (9-Fluorenylmethylchloroformiat) in Bezug auf den pH-Wert der Derivatisierungslösung, die Reaktionszeit und die Reaktionstemperatur optimiert. Die Derivatisierungsausbeute (DA) und die Verluste an gebildetem Derivat, die durch nachfolgende Flüssig-flüssig Extraktion mit Cyclohexan entstehen, wurden mit der HPLC ermittelt.

Sehr gute DA von > 98% wurden für die amphoteren Aminoaromaten gefunden. Für die Aminonitroaromaten dagegen sank die DA auf unter 50% ab.

Für ausgewählte Analyte wurden Verfahren der Trennung und Bestimmung nach Derivatisierung mit FMOC-Cl erarbeitet. Ein Verfahren nutzte HPLC mit nachfolgender photometrischer Detektion. Ein zweites Verfahren nutzte zur Trennung MEKC mit nachfolgender photometrischer Detektion. Für beide Verfahren wurden lineare Kalibrierfunktionen im Konzentrationsbereich von 0,25 bis 9 mg/L erhalten. Die berechneten Korrelationskoeffizienten für die Kalibriergeraden sind für beide Verfahren nahezu identisch. Bei der Berechnung der Nachweis- (NG) und Bestimmungsgrenzen (BG) zeigte sich, daß die Werte für das HPLC-Verfahren um den Faktor 2-7 niedriger sind als mit dem MEKC-Verfahren. Mit dem MEKC-Verfahren gelingt jedoch die Trennung der gebildeten Derivate bei annähernd gleicher erreichter Auflösung in weniger als der Hälfte der Zeit.

16 Literatur

- 1 H. Engelhardt, W. Beck, T. Schmitt
Kapillarelektrophorese - Methoden und Möglichkeiten
Vieweg Verlag 1994
- 2 S.F.Y. Li
Capillary electrophoresis - principles, practice and applications
Elsevier science publishers 1992
- 3 J. Vindevogel, P. Sandra
Introduction to micellar electrokinetic chromatography
Hüthig Verlag 1992
- 4 D.E. Burton, M.J. Sepaniak, M.P. Maskarinec
Evaluation of the use of various surfactants in micellar electrokinetic capillary chromatography
J. Chromatogr. Sci. 25 (1987) 514
- 5 O. Brüggemann, R. Freitag
Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil samples by micellar electrokinetic capillary chromatography with photodiode-array detection
J. Chromatogr. 717 (1995) 309
- 6 P.D. Grossman
Factors affecting capillary electrophoresis
in: Capillary electrophoresis – Theory and practice
Academic press, Inc. 1992
- 7 S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikama, A. Tsuchia, T. Ando
Electrokinetic separations with micellar solutions and open tubular capillaries
Anal. Chem. 56 (1984) 111
- 8 S. Terabe, K. Otsuka, T. Ando
Electrokinetic chromatography with micellar solution and open-tubular capillary
Anal. Chem. 57 (1985) 834
- 9 P. Fromherz
Tensid-Micellen: Ihr molekulares Gefüge
Nachr. Chem. Tech. Lab. 29 (1981) 537
- 10 J.C. Giddings
Maximum number of components resolvable by gel filtration and other elution chromatographic methods
Anal. Chem. 39 (1967) 1027

-
- 11 K. Otsuka, S. Terabe, T. Ando
Electrokinetic chromatography with micellar solutions, separation of phenylhydantoin-amino acids
J. Chromatogr. 332 (1985) 219
 - 12 D. Crosby, Z. El Rassi
Micellar electrokinetic capillary chromatography with cationic surfactants
J. Liquid Chromatogr. 16 (1993) 2161
 - 13 D.A. Armstrong
Sep. Purif. Methods 14 (1985) 213
 - 14 U. Pyell, U. Bütehorn
Optimization strategies in micellar electrokinetic capillary chromatography. Optimization of the temperature of the separation capillary
Chromatographia 40 (1995) 69
 - 15 M.J. Rosen, in
Surfactants and interfacial phenomena, 2nd ed
Wiley, New York 1989, 108
 - 16 F. Krafft, H. Wiglow
Über das Verhalten der fettsauren Alkalien und Seifen in Gegenwart von Wasser
Ber. 28 (1895) 2566
 - 17 T. Kaneta, S. Tanaka, M. Taga, H. Yoshida
Migration behavior of inorganic anions in micellar electrokinetic capillary chromatography using a cationic surfactant
Anal. Chem. 64 (1992) 798
 - 18 C. Quang, J.K. Strasters, M.G. Khaledi
Computer-assisted modeling, prediction, and multifactor optimization in micellar electrokinetic chromatography of ionizable compounds
Anal. Chem. 66 (1994) 1646
 - 19 A.W. Archer
Analysis of vanilla essences by high-performance liquid chromatography
J. Chromatogr. 462 (1989) 461
 - 20 M.T. Belay, C.F. Poole
Determination of vanillin and related flavor compounds in natural vanilla extracts and vanilla-flavored foods by thin layer chromatography and automated multiple development
Chromatographia 37 (1993) 365
 - 21 F.J. Winkler, H.L. Schmidt
Application possibilities of ^{13}C -isotope mass spectrometry in food analysis
Z. Lebensm. Unters. Forsch. 171 (1980) 85

-
- 22 231. Food-related application of high-resolution NMR - Part II -
Differentiation between natural and synthetic vanillin samples using ^2H -NMR
Helv. Chim. Acta 66 (1983) 2342
- 23 D.E. Burton, L.L. Powell, X. Xi
Reproducibility of the determination of caffeine in coffee by micellar
electrokinetic capillary chromatography
J. Microcol. Sep. 6 (1994) 5
- 24 K. Otsuka, S. Terabe
Effects of pH on electrokinetic velocities in micellar electrokinetic
chromatography
J. Microcol. Sep. 1 (1989) 150
- 25 P.G.H.M. Muijselaar, H.A. Claessens, C.A. Cramers
Parameters controlling the elution window and retention factors in micellar
electrokinetic capillary chromatography
J. Chromatogr. 696 (1995) 273
- 26 H.T. Rasmussen, H.M. McNair
Influence of pH on elution behavior in micellar electrokinetic capillary
chromatography
J. High Resol. Chromatogr. 12 (1989) 635
- 27 U. Bütehorn, U. Pyell
Optimization strategies in micellar electrokinetic capillary chromatography.
One-parameter optimizations of the concentration of sodium dodecyl sulfate
and the concentration of modifiers (urea and glucose)
Chromatographia 40 (1995) 175
- 28 Z.H. Shihabi, M.E. Hinsdale
Sample matrix effects in micellar electrokinetic capillary electrophoresis
J. Chromatogr. B 669 (1995) 75
- 29 M. Ackermans, F. Everaerts, J. Beckers
The pseudo-effective mobility as a parameter for screening
J. Chromatogr. 585 (1991) 123
- 30 H. Crabtree, I. Ireland, N. Dovichi
Effect of acetonitrile in the sampling solution on the analyte peak shape in
micellar electrokinetic capillary chromatography
J. Chromatogr. 669 (1994) 263
- 31 S. Fujiwara, S. Honda
Determination of ingredients of antipyretic analgesic preparations by micellar
electrokinetic chromatography
Anal. Chem. 59 (1987) 2773

- 32 S. Fujiwara, S. Iwase, S. Honda
Analysis of water-soluble vitamins by micellar electrokinetic capillary chromatography
J. Chromatogr. 447 (1988) 133
- 33 K. Otsuka, S. Terabe, T. Ando
Quantitation and reproducibility in electrokinetic chromatography with micellar solutions
J. Chromatogr. 396 (1987) 350
- 34 U. Bütehorn, U. Pyell
Optimization of resolution in micellar electrokinetic chromatography via computer-aided variation of concentrations of sodium dodecyl sulfate and acetonitrile as modifier
J. Chromatogr. 772 (1997) 27
- 35 U. Pyell, U. Bütehorn
Optimization of resolution in micellar electrokinetic chromatography via computer-aided simultaneous variation of concentrations of sodium dodecyl sulfate and urea as modifier
J. Chromatogr. 716 (1995) 81
- 36 S. Terabe, Y. Ichihama, H. Nishi, T. Fukuyama, K. Otsuka
Effect of urea addition in micellar electrokinetic chromatography
J. Chromatogr. 545 (1991) 359
- 37 U. Bütehorn, U. Pyell
Simultaneous use of urea and acetonitrile as organic modifiers for optimization of resolution in micellar electrokinetic chromatography
J. Chromatogr. 792 (1997) 157
- 38 L.R. Snyder
Changing reversed-phase high performance liquid chromatography selectivity. Which variables should be tried first ?
J. Chromatogr. B 689 (1997) 105
- 39 H. Nishi, N. Tsumagari, S. Terabe
Effect of tetraalkylammonium salts on micellar electrokinetic chromatography of ionic substances
Anal. Chem. 61 (1989) 2434
- 40 Beilsteins Handbuch der Organischen Chemie, 4th ed.,
viertes Ergänzungswerk, Vol. 10, zweiter Teil,
Springer Verlag, Berlin, 1983, 1459
- 41 Handbook of Chemistry and Physics, 60th ed.
CRC Press, Boca Raton, FL, 1979

-
- 42 D.J. Pietrzyk, S. Chen, B. Chanthawat
Enhanced capillary zone electrophoresis separation of dinitrophenylamino acids derivatives through control of electroosmotic flow by buffer cation
J.Chromatogr. 755 (1997) 327
- 43 R. Brechtel, W. Hohmann, H. Rüdiger, H. Wätzig
Control of the electroosmotic flow by metal-salt-containing buffers
J.Chromatogr. 716 (1995) 97
- 44 D.W. Fuerstenau
Streaming potential studies on quartz in solutions of aminium acetates in relation to the formation of hemimicelles at the quartz-solution interface
J. Phys. Chem. 60 (1956) 981
- 45 J.R. Mazzeo, I.S. Krull
Examination of variables affecting the performance of isoelectric focussing in uncoated capillaries
J. Microcol. Sep. 4 (1992) 29
- 46 P.F. Vogt, J.J. Gerals
Amines, aromatic in:
Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A 2, S. 37-56
VCH, Weinheim, 5. Aufl. 1985
- 47 G. Rippen
Handbuch Umweltchemikalien (Loseblattsammlung)
Stand der 11. Ergänzungslieferung 8/1991
ecomed, Landsberg, 1990
- 48 L. Fishbein,
„Aromatic Amines“, in: „The Handbook of Environmental Chemistry“,
Springer-Verlag, Berlin (1984)
- 49 Schreiben des Bundesgesundheitsamtes vom 31.03.1980 betr. Grenzwerte von kanzerogenen Trinkwasserinhaltsstoffen und Risikoabschätzung bei der Trinkwassergewinnung im Gebiet der Trihalde Stadtallendorf
- 50 E. Pfeil,
FB Chemie der Philipps-Universität Marburg,
Gutachten vom 27.11.1973
- 51 Z. Cai
Untersuchung von aromatischen Nitroverbindungen in Wasser mit GC/MS und GC/MS/SIM
Dissertation, Philipps-Universität Marburg
- 52 P. Mußmann, A. Preiß, K. Levsen, G. Wünsch
Method development for the analysis of nitrotoluenes, nitramines and other organic compounds in ammunition waste water
Vom Wasser 82 (1994) 79

-
- 53 L. Wennrich, U. Lewin, W. Engewald
Analytik von Diamino- und Aminonitroaromaten in Wasser mittels
Festphasenextraktion und HPLC
Vom Wasser 86 (1996) 341
- 54 F.P.M. Karg, G. Koss
Rüstungsaltslasten - Untersuchung zur Umweltchemie, Kontaminations-
erkundung und -bewertung
UWSF-Z. Umweltchem. Ökotox. 5 (1993) 182
- 55 G. Fuchs, M. el Said Mohamed, U. Altenschmidt, J. Koch, A. Lack,
R. Brackmann, C. Lochmeyer, B. Oswald
„Biochemistry of Microbiol Degradation“
1994 Kluwer Academic Publisher, C. Ratledg (ed.) 1994, 513
- 56 K. Spiegel, T. Welsch
Monitoring degradation processes of explosives by HPLC analysis with UV-
and amperometric detection
Fresenius J. Anal. Chem. 357 (1997) 333
- 57 J.B. Robertson, J.C. Spain, J.D. Haddock, D.T. Gibson
Oxidation of Nitrotoluenes by Toluene Dioxygenase: Evidence for a
monooxygenase Reaction
Appl. Environ. Microbiol. 58 (1992) 2643
- 58 M. Petersmann
Untersuchung von Wasserproben aus dem Bereich einer Rüstungsaltslast auf
polare aromatische Amine mit Hilfe der HPLC nach Festphasenanreicherung
Dissertation, Philipps-Universität Marburg
- 59 T.C. Schmidt, K. Steinbach, E. v. Löw, G. Stork
Highly polar metabolites of nitroaromatic compounds in ammunition waste
water
Vortrag, International Congress on Analytical Chemistry, Moskau, 1997
Chemosphere 37 (1998) 1079
- 60 T.C. Schmidt, M. Petersmann, L. Kaminski, E. v. Löw, G. Stork
Analysis of aminobenzoic acids in waste water from a former ammunition
plant with HPLC and combined diode array and fluorescence detection
Fresenius J. Anal. Chem. 357 (1997) 121
- 61 K. Blau, J.M. Halket (Ed.)
„Handbook of Derivatives for Chromatography“
second edition, John Wiley & Sons, 1993
- 62 S. Einarsson, B. Josefsson, S. Lagerkvist
Determination of amino acids with 9-fluorenylmethyl chloroformate and
reversed-phase high-performance liquid chromatography
J. Chromatogr. 282 (1983) 609

-
- 63 T. Näsholm, G. Sandberg, A. Ericsson
Quantitative analysis of amino acids in conifer tissues by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection of their 9-fluorenylmethyl chloroformiate derivatives
J. Chromatogr. 396 (1987) 225
- 64 A.J. Shah, M.W. Adlard
Determination of β -Lactams and their biosynthetic intermediates in fermentation media by pre-column derivatisation followed by fluorescence detection
J. Chromatogr. 424 (1988) 325
- 65 J. Pietsch, W. Schmidt, F. Sacher, H.J. Brauch, E. Worsch
Liquid chromatographic determination of polar organic nitrogen compounds and their behaviour during drinking water treatment
Vom Wasser 88 (1997) 119
- 66 B. Gustavsson, I. Betnér
Fully automated amino acid analysis for protein and peptide hydrolysates by precolumn derivatization with 9-fluorenylmethylchloroformiate and 1-amino-adamantan
J. Chromatogr. 507 (1990) 67
- 67 C. Böhme
Festphasenextraktion amphoterer Aminoaromaten an graphitisiertem Kohlenstoff
Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg
- 68 Dj. Djozan, M. A. Faraj-Zadeh
Liquid chromatographic determination of nitroaromatics in water following solid phase extraction, pre-column reduction and derivatization
Chromatographia 43 (1996) 25
- 69 M. Longo, A. Cavallaro
Determination of aromatic amines at trace level by derivatization with heptafluorobutyric anhydride and gas chromatography-electron-capture negative-ion chemical ionization mass spectrometry
J. Chromatogr. 753 (1996) 91
- 70 W. Thormann
Capillary Electrophoresis and Elektrokinetic Capillary Chromatography of Drugs in Body Fluids
in: N.A. Guzman (Ed.), „Capillary Electrophoresis Technology“
Marcel Dekker (1993)
- 71 D.E. Burton, L.L. Powell, X. Xi
Reproducibility of determination of caffeine in coffee by micellar electrokinetic capillary chromatography
J. Microcol. Sep. 6 (1994) 5

- 72 K.D. Altria
Investigation into the effects of sample dissolving solvents and sample matrices on the separations obtained in capillary electrophoresis. Part II. MECC
J. High. Resol. Chromatogr. 22 (1999) 55
- 73 E. Mussenbrock
Die Bestimmung von Explosivstoffen in Böden mit Hilfe der mizellaren elektrokinetischen Kapillarchromatographie
Dissertation, Universität Münster
- 74 W. Kleiböhmer, K. Camman, J. Robert, E. Mussenbrock
Determination of explosives residues in soils by micellar electrokinetic capillary chromatography and high-performance liquid chromatography - A comparative study
J. Chromatogr. 638 (1993) 349
- 75 K. Camman, W. Kleiböhmer, E. Mussenbrock
Die mizellare elektrokinetische Kapillarchromatographie eine Konkurrenz für die HPLC ?
GIT 38 (1994) 162
- 76 T. Watanabe, A. Yamamoto, S. Nagai, S. Terabe
Micellar electrokinetic chromatography as an alternative to high performance liquid chromatography for separation and determination of phenolic compounds in Japanese spirituous liquor
J. Chromatogr. 793 (1998) 409
- 77 A. Farran, S. Ruiz, C. Serra, M. Aguilar
Comparative study of high-performance liquid chromatography and micellar electrokinetic capillary chromatography applied to the analysis of different mixtures of pesticides
J. Chromatogr. 737 (1996) 109
- 78 B.G.M. Vandeginste, R. Szücs, K. Verleysen, G.S.M.J.E. Duchateau, P. Sandra
Analysis of phospholipids in lecithins. Comparison between micellar electrokinetic chromatography and high-performance liquid chromatography
J. Chromatogr. 738 (1996) 25
- 79 K.C. Chan, G.M. Janini, G.M. Muschik, H.J. Issaq
Laser-induced fluorescence detection of 9-fluorenylmethyl chloroformate derivatized amino acids in capillary electrophoresis
J. Chromatogr. 613 (1993) 93

17 Anhang

17.1 Verwendete Referenzsubstanzen

In der Tab.38 sind die im Laufe der Arbeit verwendeten Referenzsubstanzen mit Bezugsquelle aufgeführt. Alle Substanzen wurden in der höchsten erhältlichen Reinheit eingesetzt. Einzelne Aminonitroaromaten sind käuflich nicht zu erwerben. Sie waren im Rahmen anderer Forschungsprojekte im AK von Herrn Dr. Steinbach und im AK von Herrn Prof. Dr. Stork synthetisiert worden.

Tab.38: Übersicht über die in dieser Arbeit eingesetzten Referenzsubstanzen mit Bezugsquelle

Substanz	Bezugsquelle
Vanillin	Janssen (Brüggen)
Vanillinsäure	Merck (Darmstadt)
Ethylvanillin	“
4-Hydroxybenzylalkohol	“
4-Methoxybenzoesäure	“
4-Hydroxy-3-methoxybenzylalkohol	Aldrich (Steinheim)
3,4-Dihydroxybenzoesäure	“
4-Hydroxybenzoesäure	Fluka (Neu-Ulm)
Piperonal	FB Chemie der Univ.-Marburg
Cumarin	“
4-Hydroxybenzaldehyd	“
4-Methoxybenzaldehyd	“
Thioharnstoff	“
Sudan III	Fluka (Buchs)
Anthracen	“

Tab.38: Fortsetzung

Substanz	Bezugsquelle
2,4-Dinitrotoluol	Merck (Darmstadt)
2,3- Dinitrotoluol	Aldrich (Steinheim)
2,5- Dinitrotoluol	“
2,6- Dinitrotoluol	“
3,4- Dinitrotoluol	“
Trinitrotoluol	Promochem (Wesel)
2-Aminobenzoessäure	Merck (Darmstadt)
3-Aminobenzoessäure	“
4-Aminobenzoessäure	“
3,4-Diaminobenzoessäure	Sigma (St. Louis)
3,5-Diaminobenzoessäure	Merck (Darmstadt)
2-Amino-4-nitrobenzoessäure	Aldrich (Steinheim)
2-Amino-5-nitrobenzoessäure	“
5-Amino-2-nitrobenzoessäure	Merck (Darmstadt)
2-Amino-4,6-dinitrobenzoessäure	AK Steinbach ^a
4-Amino-2,6-dinitrobenzoessäure	“
4-Aminosalicylsäure	Aldrich (Steinheim)
5-Aminosalicylsäure	“
2-Aminobenzolsulfonsäure	FB Chemie der Univ.-Marburg
3-Aminobenzolsulfonsäure	Aldrich (Steinheim)
4-Aminobenzolsulfonsäure	FB Chemie der Univ.-Marburg
2,5-Diaminobenzolsulfonsäure	Sigma (St. Louis)
2-Amino-5-nitrobenzolsulfonsäure	Aldrich (Steinheim)
2-Aminotoluol-4-sulfonsäure	synthetisiert ^b
4-Aminotoluol-2-sulfonsäure	Aldrich (Steinheim)
4-Aminotoluol-3-sulfonsäure	“
2-Aminotoluol-5-sulfonsäure	AK Stork ^b
2,6-Diaminotoluol-4-sulfonsäure	AK Stork ^c
4,6-Diaminotoluol-2-sulfonsäure	“
2-Amino-4-nitrotoluol-5-sulfonsäure	“

Tab.38: Fortsetzung

Substanz	Bezugsquelle
2-Aminophenol	Riedel-de-Haën (Seelze)
3-Aminophenol	“
4-Aminophenol	“
2-Amino-3-nitrophenol	“
2-Amino-4-nitrophenol	“
2-Amino-5-nitrophenol	“
4-Amino-3-nitrobenzoesäureethylester	FB Chemie der Univ.-Marburg

- a I.I. Bil'kis, S.I. Uskov, V.D. Shteingarts
Izvestja Sibirskogo Otdelenija Akademii Nauk SSSR;
 Serijachimiceskich nauk
 Novosibirsk 3 (1987) 111
- b M. Petersmann, Diplomarbeit, Marburg, 1992
- c M. Petersmann, Dissertation, Marburg, 1995

17.2 Verwendete Chemikalien

Alle in Tab.39 aufgelisteten Chemikalien wurden in dieser Arbeit in der höchstmöglichen Reinheit eingesetzt.

Tab.39: Die in dieser Arbeit verwendete Chemikalien mit Bezugsquelle

Chemikalien	Bezugsquelle
Dodecyltrimethylammoniumbromid	Fluka (Neu-Ulm)
Tetradecyltrimethylammoniumbromid	Acros (New York)
Cetyltrimethylammoniumbromid	Merck (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat	Roth (Karlsruhe)

Tab.39: Fortsetzung

Chemikalien	Bezugsquelle
Borsäure	Merck (Darmstadt)
Dinatriumtetraborat	“
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	“
Salzsäure	FB Chemie der Univ.-Marburg
Essigsäure	Riedel-de-Haën (Seelze)
Natriumacetat-Trihydrat	FB Chemie der Univ.-Marburg
Acetonitril	“ (Über 50cm Vigreuxkolonne destilliert)
Harnstoff	Merck (Darmstadt)
Dimethylformamid	“
Dimethylsulfoxid	“
Ethanol	“
Hexamethoniumbromid	Aldrich (Steinheim)
Tetrabutylammoniumbromid	Merck (Darmstadt)
Octyltrimethylammoniumbromid	Fluka (Buchs)
Cäsiumchlorid	Riedel-de-Haën (Seelze)
Kaliumchlorid	“
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt)
Bariumchlorid	Riedel-de-Haën (Seelze)
Hydroxypropylmethylcellulose	Sigma (St. Louis)
Methanol	Merck (Darmstadt)
9-Fluorenylmethylchloroformiat	Fluka (Neu-Ulm)
Phosphorsäure	FB Chemie der Univ.-Marburg
Natriumdihydrogenphosphat	“
Natriumhydrogencarbonat	“
Natriumcarbonat	“
Kaliumdihydrogenphosphat	“
Dinatriumhydrogenphosphat	“

Tab.39: Fortsetzung

Chemikalien	Bezugsquelle
Glycin	“
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Citronensäure	FB Chemie der Univ.-Marburg
Natriumcitrat	Riedel-de-Haën (Seelze)
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt)

17.3 Verwendete Geräte und Software

17.3.1 MEKC-System:

Kapillarelektrophoresegerät P/ACE 2200 der Firma Beckman (Fullerton, USA),
Software „System Gold“ der Firma Beckman zur Datenaufnahme

17.3.2 HPLC-System:

HPLC-Pumpe P 580 HPG der Firma Gynkotec (Germering),
Membran-Degaser Degasys DG-1310 der Firma Gynkotec (Germering),
Autosampler 2157 der Firma Pharmacia (Uppsala, Schweden),
Dioden-Array-Detektor Spectro-Monitor 5000 von Thermo-Separations Products
(Florida, USA),
Fluoreszenzdetektor Fluoreszenz-Monitor 8450 der Firma Shimadzu (Tokio, Japan),
Software „LC-Talk“ der Firma Thermo-Separations Products (Florida, USA) zur
Datenaufnahme